THE JOURNAL
OF
BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 24

TOKYO

1936

THE JOURNAL
OF
BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 24

TOKYO

1936

Copyright 1936

by

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS TO VOLUME 24.

No. 1, July, 1936.

Page

ONOE, Tamenobu. Biochemical studies on carbohydrates. XVI. "Vitellomucoid" 1
XVII. Behaviours of mucoids of egg white and of yolk during the development of chick 9
YOSINAGA, Tosio. Spaltung des Lecithins. Abtrennung des Cholins aus dem Lecithin durch die Takadiastase 21
SAKAKIBARA, Ihoe. Das Antigen der Wassermann'schen Reaktion 31
OZAKI, Genei. Biochemical studies on carbohydrates. XVIII. On the carbohydrate complex of serum mucoid 73
MORIYAMA, Miyoji. Biochemische Untersuchung über die Naphthalin-Linsenkatarakt 81
KITAGAWA, Matsunosuke. Studies on a diaminoacid, canavanin. V. The synthesis of canalin 107
REMESOV, Igor. Dependence of the biological effect of sexual hormones on their chemical structure 113
TSUGE, Yukio. Gewebsoxydation der Nukleinsäure. II. Mitteilung: Über fermentative Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Muskel ... 127
III. Mitteilung: Über fermentative Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Blute 133
ICHIOKA, Fuyutaroo. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des Kaninchens. I. Mitteilung. Über die proteolytischen Fermente des Mazerationssaftes von Pankreas und Dünndarmscheimhaut des Kaninchens 139

No. 2, September, 1936.

TAKATA, Yasuwo. Umsatz der Fettstoffe in den Nervengeweben der Taube bei der B-Avitaminose 153
OKUDA, Yuzuru and KATAI, Kitaro. On the cystine content of hair and feathers 207
WATANABE, Kuniichi. Biochemical studies on carbohydrates. XIX. A note on the Theis and Benedict method when applied to determining free phenols in tissue 215
MASAMUNE, Hajime and HOSHINO, Susumu. Biochemical studies on carbohydrates. XX. On the prosthetic group of ovomucoid 219
MATSUOKA, Yoshimasa. Beiträge zur Kenntnis des sogenannten gebundenen Blutzuckers. III. Mitteilung: Über den Einfluss der Pankreas- und Nebennierenfunktion auf den sogenannten gebundenen Blutzucker.. 225

SMORODINZEW, J. A. und K. W. BEBESCHIN. Altersveränderungen am Gesamtstickstoff und an den Lipoiden im Kinderhirn 245
TAKATA, Yasuwo. Über die Bestimmung der Fettstoffe im Blut 257
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des Kaninchens. II. Mitteilung: Über die proteolytischen Fermente des Pandreassaftes 267
ITOH, Ryoji. Spectroscopic studies on purified enzymes. II. Report. On lipase, urease and typosinase 279
WATANABE, Kuniichi. Biochemical studies on carbohydrates. XXI. Assimilability and disintegration chemism of N-monoacetylglucosamine.. 287
XXII. On animal β-N-monoacetylglucosaminidase. Preliminary report 297
XXIII. On animal β-N-monoacetylglucosaminidase. II. Report: Purification of the enzyme 305
XXIV. On animal β-N-monoacetylglycosaminidase. III. Report: Kinetics of the enzyme action 315
KITASATO, Torao. Über Xylenol-β-d-glucoside 327

No. 3, November, 1936.

KIYOHARA, Kan-ichi und Shozo IZAWA. Über die Wirkung des Harns schwangerer Frauen auf die Sauerstoffatmung des Ovariums 337
MATSUOKA, Yoshimasa. Beiträge zur Kenntnis des sogenannten gebundenen Blutzuckers. IV. Mitteilung. Über die Bedeutung des reticuloendothelialen Systems für den sog. geb. Blutzucker 355
KOBAYASHI, Choe. Über die Extraktion der Phosphatase und der Carboxylase der Hefe 367
OGAWA, Konosuke. Über die fermentative Lysolezithinbildung 389
MIYAZAKI, Masaki. A contribution to the fat metabolism. The first report. Experimental studies on the influence of high-fat diet upon the fat-carbohydrate metabolism 407
TSUGE, Yukio. Gewebsoxydation der Nucleinsäure. IV. Mitteilung: Über die Mitwirkung des Co-Fermentes auf Dehydrierung durch Gegenwart von Nucleinsäuredehydrogenase 423
YASUDA, Morio. Further contributions to the micro determination of cholesterol 429
YASUDA, Morio. On the Liebermann-Burchard reaction of bound cholesterol 443
IWABUCHI, Takeo. Studien über die Arginase 447
YAMAMOTO, Kumakichi. Über die Phosphorsäureveresterung in Erythrocyten 461
YASUE, Shun-ichi. The effect of adrenalectomy on the cholesterol contents of tissues and organs 483

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XVI. "Vitellomucoid".

By

TAMENOBU ONOE.

(*From the Medico-chemical Institute. Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. M. Masamune.*)

(Received for publication, April 13, 1936)

In 1932, an attempt was made by E. G. Schenck to isolate mucoid from egg yolk, while singularity of the substance obtained was doubtful, as he himself mentioned, owing to the fact that tryptophane was lost on repetition of dialysis. No further detailed study of it except the estimation of carbohydrate, tyrosin and tryptophane was performed by him.

The writer prepared it by procedures different from that of Schenck's, which consisted in saturation of yolk solution with ammonsulfate and treatment of the dialysed and condensed filtrate with alcohol, and designated it "vitellomucoid", as he found the substance to differ perfectly from ovomucoid. The chemical and physical properties of it are noted in the following, accompanied with those of ovomucoid for comparison.

A. Preparation methods.

The first method.

The yolk of a sterile White Leghorn egg was put into 0.9% saline solution and washed with a hair pencil, fixing the yolk at the chalaza in order to dissolve the ovoglobulin satisfactorily. It was then transferred into distilled water, shaken and taken out by means of a pored spoon, after having been cut off from chalaza, and the adhering water was finally adsorbed off with a strip of filter paper.

10 yolks thus perfectly cleaned, were weighed together, stirred up with the equal volume of 8% NaCl solution and removed from lecithin and fat by repeated extraction in a separatory funnel first with an alcohol ether mixture (25:75), next with many changes of alcohol, using the volume equal to that of the yolk solution in each case. When the final extract remained colourless, the solution was passed with a current of air for expelling ether, and dialysed in an ox bladder against distilled water, at least for 2 days after addition of alcoholic 20% thymol solution in the proportion of 0.5 cc. to 100 cc. and the coming out vitellin was separated and washed by centrifugalization. The washings were combined with the mother liguer, the whole was evaporated to about 50 cc. on the water bath, and half saturated with ammonium sulfate, whereby livetin is precipitated. After letting stand for one day, the latter was collected on a funnel and washed with small portions of half saturated ammonsulfate solution. The filtrate with washings was dialysed against tap water and distilled water until the outer liquid showed no sulfate reaction anymore. The solution was finally condensed to a small volume on the boiling bath, added to with 5 to 10 volumes of alcohol, and the crude mucoid which had fallen out was purified by repetition of dissolving in water and treatment with alcohol. Yield of the air dry substance was in averages 0.109% of yolk.

To settle the question, if the substance obtained might be a mixture composed of more than one single protein, the purified substance was deposited partially from its watery solution by 2/3 saturation of ammonium sulfate, and the optical rotation of this fraction and total reduction power of its hydrolysate were estimated after the precipitate was purified by dialysis. The values attained were nearly the same as before the fractionation, namely: $[\alpha]_D^{21}$ was $-25.0°$ in conc. of 1% and the total reduction corresponded to 36.3% of sugar calculated as glucose. (confer below).

The second method.

10 clean yolks removed completely from egg white were strained well, shaken with an equal part of ether alcohol mixture

(1:1) and the precipitate was collected on a Büchner's funnel. It was submitted further to exhautsive extraction with many changes of the above mixture, pulverized and stirred up with 600 cc. of water. The mixture was then boiled under reflux after addition of 300 cc. of 95% alcohol, and being acidified to pH 5 with 30% acetic acid. After the lapse of 5 hours, the insoluble residue was removed, and the mucoid was separated by treating the supernatant liquor with 5 to 10 parts of alcohol. It was purified by redissolving in water and re-precipitation with alcohol. The yield, in averages, 0.095% of yolk.

B. The chemical and physical properties.

The purified product is hygroscopic and contains 16 p. c. of moisture, as calculated from the loss of weight in vacuo (3 mm Hg) over P_2O_5. It is soluble perfectly in water and involves a nearly definite amount of inorganic matter, which even prolonged dialysis could not remove.

Analysis.

The substance as dried at 18 mm Hg and 40°–45°C analysed as follows:

I. 2.433 mg substance: 2.987 mg CO_2 (33.48% C), 1.597 mg H_2O (7.34% H) 0.558 mg ash.
II. 2.168 mg substance: 2.673 mg CO_2 (33.62% C), 1.464 mg H_2O (7.56% H) 0.488 mg ash.
I. 1.832 mg substance: 0.140 cc. (22°C. 755.5 mm) N (8.79%)
II. 1.742 mg ,, : 0.139 cc. (22°C. 754.0 mm) N (9.08%)
I. 5.958 mg substance: 1.236 mg $BaSO_4$ (2.85% S)
II. 5.625 mg ,, : 0.978 mg $BaSO_4$ (2.39% S)

(Ovomucoid: C, 48.85. H, 6.92 N, 12.46 S, 2.22% (Zanetti))

Either the molybdate test for phosphate after ignition or the iodine test of its solution for glyogen resulted in negative.

The incombustible residue is insoluble in water, soluble in hydrochloric acid and the flame test revealed the presence of Ca.

Precipitation tests.

The protein reactions are tabulated below.

TABLE I.

Test	Vitellomucoid:	Ovomucoid:
Heat coagulation	no precip.	no precip.
With fest trichloracetic acid	flocculation($\frac{+}{++}$)	faint turbidity
By 2/3 saturation with ammonium sulfate	flocculation($\frac{+}{++}$)*	flocculation
With fest sulfosalicylic acid	trace	no precip.
With 25% mercuric acetete solution	no precip.	——
With equal part of 25% phosphotungstic acid	faint turbidity	flocculation($\frac{+}{++}$)
Ferricyanide acetic acid reaction	faint turbidity	no precip.
Saturation with sodium sulfate	flocculation(+)	flocculation(+)
At the junction with sat. lead subacetate solution	cloudy ring(+)	no precip.
With fest tannic acid	precip.	precipitated more readily
By saturation with NaCl.	flocculation(+)	no precip.

* 2/3 saturation precipitates out 38% (determined by the weight of the deposit) and saturation 55% (determined by measuring the reduction power of the mother liquor after hydrolysis) of the substance out of its watery solution.

Colour reactions.

The vitellomucoid solution showed all the following protein reactions: biuret, Folin's amino acid, ninhydrin, Millon's, diazo-, Hopkins-Cole's, xanthoprotein, Ehrlich's *p*-dimethylaminobenzaldehyde, lead sulfide, Sakaguchi's and Molisch reactions.

Optical activity.

Vitellomucoid rotates the polarized *D*-light by $-24.7°$ at 22°C: $[\alpha]^{22}_{D} = -0.363 \times 3.0432/1 \times 0.0446 \times 1.003 = -24.7°$ (Ovomucoid: $[\alpha]^{22}_{D} = -0.856 \times 3.0366/1 \times 0.0411 \times 1.0033 = -63.0°$).

Isolation of glucosamine from vitellomucoid as the tetrabenzoate.

306 mg of the dry vitellomucoid was mixed in a porcelain dish with 20 cc. of fuming hydrochloric acid and condensed to a small volume by gentle boiling and finally almost to dryness on a steam bath. The dark residue was dissolved in 20 cc. of water, treated with animal black and the filtrate was evaporated again to a few cc. After being cooled, it was slightly alkalinized with 10% sodium hydroxide and a flocculent precipitate which fell out thereupon was removed after being washed with a little water. The filtrate combined with the washing was shaken with 5 cc. of benzoyl chloride and 35 cc. of 10% NaOH for 20 min., the water layer decanted off and the half liquid benzoylation product was taken up in hot alcohol, after having been washed with water. The alcoholic solution was evaporated under reduced pressure at 40°C, the residue extracted with chloroform and the solution was again concentrated in a similar manner. Crystals in typical needles came out when the hot alcoholic solution of the remaining syrup was cooled. The yield from alcohol recrystallised product was 25 mg and m. p. 199°C. No depression of melting point took place when the substance was mixed with tetrabenzoylglucosamine.

Quantitative analysis of glucosamine.

Glucosamine was estimated by the *p*-dimethylaminobenzaldehyde method of Masamune and Nagazumi (unpublished), taking 27.2 mg of the dry substance for hydrolysis and 4/25 of the hydrolysate for colour comparison after neutralizing and making it up to 25 cc.

The colour depth equaled that developed by 0.439 mg of glucosamine, namely, 10.1% of the mucoid is taken up by the aminosugar.

Total reduction.

1.4 mg of the dry substance were taken up in 8 cc. of 1*n*. hydrochloric acid and was heated with a reflex condensor for 4

hours. The solution was then cooled, made up to 12 cc. with water after being neutralized with 2 cc. of 4 *n*. NaOH and the reduction power was estimated according to Fujita, after addition of 4 cc. of 0.005 *n*. ferricyanide solution. 3.09 cc. of the latter were reduced which amount to 36.4% of the mucoid, when calculated as glucose (ovomucoid: 31%).

Qualitative and quantitative analysis of the non-aminosugar.

It was analysed by the orcinol method of Tillmans and Philippi, with a minor modification (Ozaki) and by indole and diphenylamine I reactions (Dische), by calculating from the curves plotted by Ozaki. The result is illustrated in Table II.

Table II.

Percentage of vitellomucoid employed for analysis	Reaction	Percentage of mucoid taken up by sugar calc. as			
		Glucose	Mannose	Galactose	3 mannose + 1 glucosamine
0.15	Orcinol-	30.0	20.4	18.7	
„	Indole-	14.0	20.4	19.3	20.0
„	Diphenylamine-I.	22.7	20.3		31.3
0.05	Orcinol-	26.0	20.0	20.0	
„	Indole-	15.0	20.0	18.0	20.0
„	Diphenylamine-I.	24.0	20.0	38.0	32.0
		20.2 (average)			

The values coincide well with one another, when calculated as mannose, irrespective both of the mucoid concentration in the solution analysed and of the kind of reaction, while, otherwise, they diverge from one another remarkably. Therefore, the non-aminosugar is mannose, which takes up 20.2% of vitellomucoid and the molecular ratio of mannose to glucosamine is 20·2/180 : 10·1/179 = 2·0.

According to Masamune and Hoshino, ovomucoid contains

mannose and glucosamine in the equimolecular proportion (private communication) so that the carbodydrate fraction of vitellomucoid is not identical with that of ovomucoid.

Conclusively, the chemical and physical properties above recorded prove that the substance isolated is a new mucoid which differs far from ovomucoid and accordingly the writer denominates it "vitellomucoid".

Isoelectric point.

In order to determine the isoelectric point of vitellomucoid approximately, viscosity measurement was carried out by means of an Ostwald's viscosimeter. 2 cc. of 3% solution was added to 1 cc. of acid or of alkali, and pH of the mixtures was estimated by the indicator method of Clark and Lubs. The bath temperature was kept strictly at 30°C.

TABLE III.
Time of outflow for pure water: $45\frac{4}{5}$ seconds.

Sol.	Conc. of acid or of alkali added	pH	Time of outflow (sec.)
No. 1	0.3 n. HCl	1.5	53.0
2	0.1 n. „	2.5	$52\frac{8}{10}$
3	0.05 n. „	4.0	$52\frac{7}{10}$
4	0.02 n. „	4.8	$52\frac{7}{10}$
5	0.01 n. „	5.3	$52\frac{4}{10}$
6	0.005 n. „	5.5	$52\frac{2}{10}$
7	0.0025 n. „	5.8	$52\frac{3}{10}$
8	dist. water	6.0	$52\frac{3}{10}$
9	0.005 n. NaOH	6.3	$52\frac{4}{10}$
10	0.01 n. „	6.7	$52\frac{7}{10}$
11	0.1 n. „	—	$54\frac{3}{10}$

The results are given in table III, according to which the isoelectric point is likely to lie round pH 5.5.

The writer is indebted for the elementary analysis to Dr. S. Kobayashi, Assistant of Professor H. Suginome in the Chemical Institute.

The Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan gave a grant toward a part of the cost of this research which is in this place gratefully acknowledged.

REFERENCES.

Dische, A. (1929): Mikrochemie., **7**, 33.
Ozaki, M. (will be published shortly): J. Biochem.
Schenck, E. G. (1932): Hoppe-Seyler's Zeits. f. physiol. Chem., **211**, 111.
Tillmans, J. and Philippi, K. (1929): Biochem. Zeits., **215**, 40.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES. XVII. Behaviours of Mucoids of Egg White and of Yolk during the Development of Chick.

By

TAMENOBU ONOE.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, April 13, 1936)

How mucoids of an egg behave both quantitatively and qualitatively is a problem of much interest from the view point of nutrition, as they are absorbed by the embryo completely at the end of development. As is expected from the preparation method of vitellomucoid in the writer's previous work, ovo- and vitello-mucoid can be separated both together from either white or yolk, whenever one of them are transferred from white to yolk or vise versa, and whether or not the substance taken out is a mixture of them is readily determined from its composition, because these two kinds of mucoid were found to contain mannose and glucosamine in different ratios. (confer Onoe 1936). This fact gives us a very favourable means for tracing their movement along the development.

Bywaters (1913) and later Needham (1927) found that there is no preferential absorption of ovomucoid from white proteins of developing eggs, the former by comparing the ratio: ovomucoid-N/ablumin-N, the latter by calculating the percentage of white taken up by ovomucoid which remained constant at various stages of incubation. Needham obtained, moreover, a curve of total mucoid in the extraembryonic remainder which gave a peak in the middle and falls finally to nil at the end of incubation, and judging from the results that in white the mucoid decreased steadily as "Bywaters claimed",[1] he tried to explain that formation of a

1) Needham said that "Bywaters.....concluded that both of albumin and ovomucoid diminished steadily in the egg white as development proceeded," but the writer can not find any description like that in the Bywaters' publication.

hump by assuming, that the mucoprotein of the yolk, a substance merely hypothetical to him, is probably much increased at the stage corresponding to that peak. He, however, had no data concerning the total weight of white and of ovomucoid of unincubated eggs and, besides, did not try to isolate the white mucoid quantitatively, as he himself mentioned.

Komori isolated ovomucoid also from developing eggs but his figures do not give us any exact information of the increase and decrease of it because the substance was taken out at dates unsuitable for the purpose in view.

In the present communication, the writer tried to prepare white- and yolk-mucoid fractions separately and most quantitatively as possible at an interval of 6 days of incubation. The 6th and 12th days are points of inflexion on curves of water contents of both white and yolk plus embryonic system (Onoe (1933), on one hand, and on the other, fall on the hump of the mentioned Needham's curve. In addition to them, coagulable proteins of white, vitellin and livetin of yolk were also isolated simultaneously. The results (Table I) are summarized as follows:

1. The quantity of white for 100 gm. of the egg weight at the commencement of incubation decreases rapidly in the first 6 days as the development proceeds, remains almost constant in the second and diminishes again gradually in the third. (Table I. Column 9).

2. Yolk in percentage of the egg weight before treatment remains constant in the first and second periods and diminished in the third. (Col. 19).

3. The absolute and relative amounts of both ovomucoid and coagulable proteins in white drop in the first and the third periods markedly while in the second, on the contrary, rises to some extent (Col. 11, 12, 14 and 15). The ratio of the amount of ovomucoid to that of coagulable protein at the commencement of incubation falls gradually through all 18 days (Col. 16).

4. All of vitellomucoid, vitellin and livetin diminish slowly until the 12th day, and on further development vitellomucoid continues to decrease its weight while the remaining two show no

fluctuation. (Col. 22, 25 and 28). The ratio of the amount of vitellomucoid to that of vitellin+livetin at the commencement of incubation remains constant throughout the whole development of chick or falls slightly. (Col. 29).

As mentioned already, Needham did not measure white mucoid before incubation and consequently missed finding that the peak on his "ovomucoidcurve" of the remainder is caused for a great part or entirely by the mucoid present in the white itself, as is seen from the figures in the second 6 days of hatching (Col. 12).

According to Schenck (1932), egg proteins, as, for example, between ablumin and conalbumin, change mutually into one another by exchange of their amino acids during the development of chick. Assuming his view is valid, the momentary rise of proteins in white in the first period, appears as if due to the supply of proteins from yolk after transformation of molecules, because, in this time, water stands still or flows back from yolk to white (Onoe, Schenck) and proteins of the former part diminish. But as will be discussed later, in so far as the mucoids are concerned, such an interpretation appears to be too forced.

As to the qualitative behaviours, estimations were exerted on nitrogen, "total reduction", amino- and non-amino-sugars and rotatory power of the mucoid specimens which had been obtained at various stages and dried perfectly (Table II and IV–VI).

The results revealed that ovomucoid undergoes no variation with respect to the above constituents and properties during the whole incubation, namely, no molecular conversion was observed whilst vitellomucoid is prone to change. At the 6th day when the rapid absorption of mucoid of white has just ceased, the nitrogen content of the mucoid in yolk is increased and the total reduction power, amino- and nocaminosugars are decreased, as if a part of the mucoid conveyed from white is retained in this portion of egg before being absorbed into the embryonic system, but the characteristic ratio between the constituents of carbohydrate of mucoid in yolk is not altered and the rotatory power of it is reduced despite that ovomucoid rotates *D*-light much stronger than vitellomucoid.

Therefore the passage of mucoid through the yolk sac is difficult to imagine, unless it is accompanied with a so sudden intramolecular transformation that beyond the boundary membrane neither the transported mucoid nor its intermediary products can be detected by analysis at all. The possibility of such a violent action in the yolk sac whose enzyme content is low is most likely to be excluded and therefore it is regarded as justified that ovomucoid is absorbed by the embryonic system directly from white.

That white transports their components to yolk or vice versa and white is absorbed indirectly by way of yolk is now generally accepted (Aggazzotti(1919), Needham, Schenck and others), while no direct argument for it is afforded by the present work in so far as mucoid concerns. Previous observations on this point of absorption mechanism have been restricted and most of them were made merely on such simple compounds as water and free sugar. Although Needham extended his opinion to ovomucoid, proteins in general which are of colossal molecule, are probably transferred to the embryonic system directly, but not through yolk, and the momentary increase of white mucoid in the second period is caused by synthesis or preferably by backflow of it from the fetal system. The fact that no albumin was separated out of the filtrate from livetin either by heating or by alcoholic treatment (refer to the procedures of protein preparation) is thought as an approval of it.

Concerning the behaviour of carbohydrate complex of ovomucoid, Bywaters observed that the percentage of carbohydrate is all the same at various stages of development while Needham claimed that egg mucoid undergoes intramolecular change not only in yolk but also in white, basing it on the findings that the substance isolated from the latter part of egg showed a gradual trend to a higher sugar content. Comparing this with the figures in table V, which were gained not by the reduction method and show true sugar values, those of Needham are not believed to give the accurate ones. The latter are too low (the average value: 11.5% calc. as glucose). Probably phosphortungstic acid he employed as a precipitant of the protein hydrolysate, deposits sugar out of the solution to a certain extent or the duration of heating with 5% HCl

was too long. As enzymic experiments, on the other hand, Komori proved that diastase cleaves sugar from ovomucoid, and Müller and Masayama and also Roger that yolk has a diastatic activity. From what Needham observed in experiments in vitro, yolk contains the so-called "ovomucoidase" which sets free reducing sugar from ovomucoid, and it was suggested that the mucoid is split up into free sugar and protein before absorption. If Needham's enzyme which splits off a reducing sugar is a single enzyme, it should belong to carbohydrase and vary the ratio of nonamino- to amino-sugar owing to the partial hydrolysis. Nevertheless, as the present results show (Table V), the constancy of composition of carbohydrate is maintained not only in ovo- but also in vitello-mucoid through the whole stages, and no evidence is afforded in favour of the partial cleavage.

The qualitative behaviours above depicted demonstrate on the other side that protein moiety of mucoid suffers gradual change along the development in yolk, while not in white.

Conclusively, ovo- and vitello-mucoid are absorbed directly to the embryonic system from white and yolk respectively, and most probably without any conversion in the former, and after transformation of the protein portion in the latter.

Experimental.

Fertile eggs of White Leghorn hens were incubateed at 40°C under standard conditions. The proteins were prepared as follows:

Separation of the proteins.

From eggs before incubation the yolk white are collected apart from white by a yolk separator used in the kitchen as quantatively as possible, and with developing eggs, a pencil mark is made on the shell at the region where the embryo lies close to the shell membrane, by exposing the egg in the beam of light cast through a hole where the egg is placed, and then it is opened at this spot carefully and after allantois, amnion and embryo have been taken out one by one, yolk and white are collected with all precautions to obtain them most completely as possible.

The white is weighed in a tared beaker after being removed from chalaza and ovomucoid and uncoagulable proteins of white are prepared by the following modified Willianen method:

The white of eggs is strained with a glass rod, 4 volumes of water are added, and the mixture is again stirred up vigourously to attain a homogeneous solution. It is then poured into 1½ volumes of boiling water, added to with 30% acetic acid as far as the final concentration of the acid in mixture attains to 0.5% and heated in the water bath for 1 hour with occasional shaking, whereby the whole coagulable proteins are precipitated out. By these manipulations the charring which takes place when boiled on an asbestos sheeting is avoided. After being cooled the precipitates are collected on a Büchner's funnel, washed with water of a volume equal to the acidified albumen solution. The filtrate and washings are combined together, condensed on a steam bath, with a constant stirring to a small volume and cooled. The solution is precipitated with 5 to 10 volumes of alcohol and centrifuged. The deposit is removed from contamination insoluble in water by treatment with a small quantity of water and reprecipitation with alcohol. The purification is repeated once more and after alcohol has been drained by means of a small Büchner's funnel, the substance is dried finally in a dessicator. The coagulable proteins separated in the meanwhile are pressed between sheetings of filter paper and dried in a dessicator similarly.

Proteins of yolk were isolated by the first preparation method in the foregoing communication (Onoe 1936) and the vitellin separated and washed was purified by submitting to dialysis and finally pressed on a porous plate. Livetin taken out was dissolved in water, dialysed in an ox bladder against running water at first, afterward against distilled water until no sulfate ions were detected in the outer liquid and dried.

Although the uncoagulable proteins from white, livetin and vitellin were not prepared in a perfectly pure state, yet they are sufficient for the aim in view.

The results are given in general in Table I.

TABLE I.

Day	Egg, number	Egg (when put in the incubator)		Egg (when takenout)		Egg-white			Ovomucoid			Coagulable proteins of white			a × 100/b
		Total gm.	Per egg (average) gm.	Total gm.	Per egg (average) gm.	Total gm.	Per egg (average) gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation	Total gm.	Per egg gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation (a)	Total gm.	Per egg gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation (b)	
0	25	1369.2	54.8			805.9	32.2	58.9	9.6	0.386	0.704	98.3	3.931	7.176	9.8
6	20	1027.5	51.4	680.1	49.0	203.6	10.2	19.8	4.7	0.236	0.457	59.8	2.991	5.85	7.8
9	5	246.9	49.4	227.4	45.5	50.98	10.2	20.7	1.3	0.256	0.518	18.8	3.757	7.609	6.8
12	29	1509.1	52.0	1366.1	47.1	268.5	9.3	17.8	7.1	0.243	0.467	105.0	3.62	6.95	6.7
18	10	538.0	53.8	459.8	46.0	76.4	7.6	14.1	1.5	0.153	0.278	26.3	2.631	4.88	5.6
Col. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Day	Egg-yolk			Vitellomucoid			Vitellin			Livetin			a′ × 100/(b′ × c′)
	Total gm.	Per egg gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation	Total gm.	Per egg gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation (a′)	Total gm.	Per egg gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation (b′)	Total gm.	Per egg gm.	P.c. of egg weight at starting of incubation (c′)	
0	419.7	16.8	30.7	0.463	0.019	0.034	69.218	2.769	5.055	6.528	0.261	0.433	0.6
6	300.8	15.04	29.275	0.273	0.014	0.027	39.3	1.97	3.824	4.0	0.199	0.39	0.6
9													
12	458.7	15.81	30.395	0.224	0.008	0.015	48.6	1.675	3.220	5.0	0.173	0.33	0.4
18	121.1	12.11	22.501	0.077	0.0077	0.014	15.3	1.531	2.844	1.8	0.184	0.33	0.4
Col.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29

Nitrogen, amino- and non-aminosugar contents of mucoids of white and yolk and their total reduction and rotatory powers.

The substance which were taken for analysis had been dried previously to a constant weight in vacuo over P_2O_5 at room temperature. The analyses were made by the following ways:

1) *Nitrogen:* by the micro-Kieldahl method. The results are given in Table II.

2) *Total reduction.*

The duration of hydrolysis:

1.848 mg of ovomucoid before incubation were taken up in 8 cc. of water, hydrolyzed by varying the length of time and analysed on the reduction power by the procedures described in the foregoing report. (Onoe 1936). The reduction power was found to arrive in 3 hours, ad maximum, and to remain constant further on. The analysis below were accordingly made by 4 hours hydrolysis.

The calculation was exerted from a diagram plotted from figures in table III, which gives reduction power not only of glucose but also of mannose, galactose and glucosamine chlorhydrate. The volume of ferricyanide solution reduced is a straight line function of sugar amount.

Table IV indicates the results on the mucoids.

3) *Amino- and nonamnio-sugar.*

The method of Masamune and Nagazumi and the orinol method were adopted as in the foregoing communication (Onoe 1936). See Table V.

4) *Rotatory power.*

In case of mucoid in white, 30 mg of the substance were dissolved in 1 cc. of water and in case of that of yolk, 10 mg in 1 cc. see Table VI.

Summarising, all estimated remained constant in the white mucoid throughout the development of egg. In the yolk mucoid they diverged from one another decidedly although to a slight extent, but, nevertheless, the ratio of aminosugar to non-amino-

TABLE II.

		Substance taken for analysis	N	
		mg	mg	%
I.	Ovomucoid before incubation	3.073	0.363	11.8
II.	„ after 6 days „	2.610	0.313	12.0
III.	„ „ 12 „ „	2.942	0.343	11.7
IV.	„ „ 18 „ „	3.011	0.3614	12.0
I.	Vitellomucoid before incubation	2.32	0.1833	7.9
II.	„ after 6 days „	1.52	0.1277	8.4
III.	„ „ 12 „ „	1.42	0.1108	7.8
IV.	„ „ 18 „ „	1.42	0.1022	7.2

TABLE III.

Weight of sugar mg	Quantity of 0.05 n. ferricyanide solution reduced cc.			
	Glucose	Mannose	Galactose	Glucosamine chlorhydrate
0.1	6.0	0.60	0.39	0.52
0.2	1.20	1.13	0.75	1.00
0.3	1.80	1.72	1.16	1.50
0.4		2.25	1.60	2.00
0.5		2.80	1.93	2.51
0.6	3.60	3.46	2.30	3.01

TABLE IV.

		Substance taken for analysis mg.	Percentage of the reducing components calc. as glucose
I.	Ovomucoid before incubation	1.68	31.0
II.	„ after 6 days „	1.34	31.0
III.	„ „ 12 „ „	1.536	30.8
IV.	„ „ 18 „ „	1.632	31.0
I.	Vitellomucoid before incubation	1.4	36.2
II.	„ after 6 days „	0.97	24.0
III.	„ „ 12 „ „	1.1	37.3
IV.	„ „ 18 „ „	1.44	35.2

TABLE V.

	Mannose			Glucosamine					
	Conc. of mucoid solution employed for analysis %	Percentage of mucoid taken up by mannose (a)	Precentage calc. as glucose from reduction power on ferricyanide (b)	Amount of mucoid taken for colour comparison mg	mg	Percentage of mucoid taken up by glucosamine (c)	Percentage calc. as glucose from reduction power on ferricyanide (d)	c/a	Total sugar calc. as glucose from reduction power on ferricyanide (b+d)
I. Ovomucoid before incubation	0.2	11.0	10.45	9.66	1.034	10.7	10.68	0.97	21.13
II. „ after 6 days „	„	11.1		7.52	0.849	11.3		1.02	
III. „ „ 12 „ „	„	11.0		7.82	0.868	11.1		1.0	
IV. „ „ 18 „ „	„	11.2		7.42	0.831	11.2		1.0	
I. Vitellomucoid before incubation	0.1	20.3	19.29	4.35	0.439	10.1	10.16	0.50	29.45
II. „ after 6 days „	„	19.6		13.10	1.258	9.6		0.49	
III. „ „ 12 „ „	„	20.1		10.16	1.046	10.3		0.51	
IV. „ „ 18 „ „	„	19.8		7.81	0.773	9.9		0.50	

sugar showed scarcely any fluctuation.

TABLE VI.

I. Ovomucoid before incubation: $[\alpha]_D^{21} = -1.82 \times 3.6093/1 \times 0.1056 \times 1.010$ $= 1.82 \times 33.8$	$= -61°.6$
II. Ovomucoid after 6 days incubation: $[\alpha]_D^{21} = -1.83 \times 33.84$	$= -61°.9$
III. Ovomucoid after 12 days incubation: $[\alpha]_D^{21} = -1.80 \times 33.84$	$= -60°.9$
IV. Ovomucoid after 18 days incubation: $[\alpha]_D^{21} = -1.81 \times 33.84$	$= -61°.3$
I. Vitellomucoid before incubation: $[\alpha]_D^{21.5} = -0.25 \times 3.2257/1 \times 0.0321 \times 1.003$ $= -0.25 \times 100.2$	$= -25°.1$
II. Vitellomucoid after 6 days incubation: $[\alpha]_D^{21.5} = -0.13 \times 100.2$	$= -13°.0$
III. Vitellomucoid after 12 days incubation: $[\alpha]_D^{21.5} = -0.32 \times 100.2$	$= -32°.1$
IV. Vitellomucoid after 18 days incubation: $[\alpha]_D^{21.5} = -0.34 \times 100.2$	$= -34°.1$

SUMMARY.

1. The absorption rates of mucoid and other proteins of egg during incubation were observed.

2. The absorption rate of mucoid from white into the embryonic system is not equal to, but higher than that of other proteins. The yolk mucoid does not appear to be absorbed preferentially to other proteins.

3. The proteins of white show a momentary increase in the period between the 6th and the 12th days.

4. White mucoid is most probably absorbed directly by the embryonic system, but not by way of yolk, and the transitory rise noted in 3. seems, consequently, to be due to its back-flow from the fetal system including amnion and allantois.

4. The mucoid do not suffer any partial cleavage in the carbohydrate fraction. Protein moiety of vitello- but not of ovo-mucoid is converted gradually in loco before absorption.

The writer desires to express his indebtedness to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant to defray the expenses of this research.

REFERENCES.

Aggazzotti, A. (1919): cited by Needham.
Bywaters, H. W. (1913): Biochem. Zeits., **55**, 245.
Komori, Y. (1926): Journ. Biochem., **6**, 1.
Müller and Masayama (1899): cited by Needham.
„ „ „ (1900): Z. Biol., **39**, 547.
Needham, J. (1927): Biochem. Journ., **21**, 733.
Onoe, T. (1933): Seikagaku no Kenkyu, **5**, 315.
„ „ (1936): Journ. Biochem., **23**,
Roger (1908): cited by Needham.
Schenck, E. G. (1932): Hoppe-Seyler's Zeits. f. physiol. Chem., **211**, 111.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

SPALTUNG DES LECITHINS.

Abtrennung des Cholins aus dem Lecithin durch die Takadiastase.

Von

TOSIO YOSINAGA.

(*Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Akademie Kumamoto. Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.*)

(Eingegangen am. 18 April 1936)

Akamatsu (1923) berichtete, dass das Lecithin durch die Takadiastase hydrolisiert und dass die Phosphorsäure und Fettsäure dadurch befreit wurde. Es ist aber noch nicht erkannt, ob das Cholin, welches das dem Lecithinmolekül spezifische Komponent ist, durch die Takadiastase aus Lecithin abtrennt oder nicht. Um diese Frage zu lösen, untersuchte ich mit Sakakibara zuerst die Bestimmungsmethode des Cholins in der Mischung des Cholins und Lecithins. Das Resultat ist in der früheren Mitteilung [Sakakibara and Yosinaga (1936)] veröffentlicht. Mit dieser Bestimmungsmethode bestimmte ich nun die Cholinmenge, welche durch die Takadiastase aus dem Lecithin abtrennt, und stellte das Optimum-P_H für diese Spaltungsmenge fest. Die daraus sich ergebenden Resultate will ich in der vorliegenden Mitteilung veröffentlichen.

Experiment.

Für das Experiment wurde das nach Sueyoshi's Methode (1931) dargestellte Eigelb-Lecithin gebraucht und mit Hilfe von Alkohol zu einer wässerigen 3% Lösung gemacht und der Alkohol gänzlich vertrieben. 0,12 g Takadiastase wurde mit 20 ccm Pufferlösung vermischt und dann 10 ccm Lecithinlösung beigegeben. Es ergaben 30 ccm 1% Lecithinlösung. Um einem Faulwerden dieser gemischten Lösung vorzubeugen, gab man einen Tropfen Chloroform bei und stellte die Mischung in einen Brutschrank bei 37°.

Auf folgender Tabelle werden nun die verschiedenen Puffer-

lösungen nach Sörensen und nach Clark und Lubs gezeigt.

pH	Sörensen		pH	Clark u. Lubs (Jedes mit Wasser auf 20 ccm aufgefüllt)	
		ccm			ccm
2,97	$m/10$ sekundär. Na-Citrat	8,00	3,0	$m/5$ Kaliumbiphthalat	5,00
	m/10 HCl	12,00		$m/5$ HCl	2,03
3,95	$m/10$ sekundär. Na-Citrat	11.00	4,0	$m/5$ Kaliumbiphthalat	5,00
	$m/10$ HCl	9,00		$m/5$ NaOH	0,04
5,0	$m/10$ sekundär. Na-Citrat	19,00	5,0	$m/5$ Kaliumbiphthalat	5,00
	$m/10$ NaOH	1,00		$m/5$ NaOH	2,39
5,9	$m/10$ KH_2PO_4	18,00	6,0	$m/5$ KH_2PO_4	5,00
	m/15 Na_2HPO_4	2,00		$m/5$ NaOH	0,57
6,98	$m/15$ KH_2PO_4	8,00	7,0	$m/5$ KH_2PO_4	5,00
	$m/15$ Na_2HPO_4	12,00		$m/5$ NaOH	2,96
8,0	$m/15$ KO_2PO_4	1,00	8,0	$m/5$ KH_2PO_4	5,00
	$m/15$ Na_2HPO_4	19,00		$m/5$ NaOH	4,68

Am 1.–6. Tag. wurde die Mischung gut geschüttelt und ein Teil der Mischung in ein Spitzglas getan; dann bestimmte ich das Cholin nach unserer Methode [Sakakibara und Yosinaga (1936)]. Ich will hier kurz die Methode der Cholinbestimmung beschreiben: Das ungespaltene Lecithin wurde durch Eisencitrat und Eisenhydroxyd gefällt, das Cholin ($C_5H_{15}O_2N$) in oberer Flüssigkeit wurde durch das Romansche Reagenz (1930), nämlich die Jodjodkalilösung, als Cholinperjodid ($C_5H_{15}O_2NJ\text{-}J_8$) gefällt. Die Cholinmenge wurde durch Titrierung der Jodmenge, welche im Cholinperjodid enthalten ist, bestimmt.

Berechnung: 1 Molekül Cholinperjodid enthält 1 mol. Cholin und 9 Atome Jod. Das Molekülgewicht des Cholins war 121,128, das Atomgewicht des Jods 126,92 und das Verhältnis Cholin: Jod im Cholinperjodid war 121,128 : 126,92 mal 9. 1 ccm n 100 $Na_2S_2O_3$-Lösung entspricht 1,2692 mg Jod, also 121,128/9 = 0,1350 mg Cholin. Man berechnet also das Cholin aus der ccm-Zahl der zur Titrierung nötigen $n/100$ $Na_2S_2O_3$-Lösung mal 0,1350 mg.

Für dieses Experiment wurde auch ein Kontrollversuch gemacht, in dem keine Takadiastase gebraucht, sondern nur folgende

gemischte Lösung: 3% Lecithin 10 ccm + Pufferlösung 20 ccm.

Die folgenden Tabelle I u. II zeigen die Resultate.

TABELLE I.

(Pufferlösung nach Sörensen)

PH = 3.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	0,87	0,1280	0,0839	0,30	0,0441
48	1,47	0,2062	0,1621	0,30	0,0441
72	1,93	0,2839	0,2320	0,35	0,0519
96	2,22	0,3266	0,2648	0,42	0,0618
120	1,82	0,2677	0,2030	0,44	0,0647
144	1,89	0,2780	0,2147	0,43	0,0633

PH = 4.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	3,92	0,5766	0,5330	0,31	0,0436
48	5,49	0,8076	0,7546	0,36	0,0530
72	6,53	0,9606	0,9076	0,36	0,0530
96	6,75	0,9929	0,9061	0,59	0,0868
120	6,99	1,0282	0,9502	0,53	0,0780
144	6,95	1,0233	0,9208	0,69	0,1015

PH = 5.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	2,68	0,3942	0,3442	0,34	0,0500
48	3,67	0,5399	0,4987	0,28	0,0412
72	4,33	0.6369	0,5850	0,35	0,0519
96	4,77	0,7017	0,6090	0,63	0,0927
120	4,63	0,6811	0.6134	0,46	0.0677
144	5,02	0,7385	0,6591	0,54	0,0794

$P_H = 6$.

Zeitdauer St.	Hauptversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Hauptversuch: Cholinmenge (a)	Hauptversuch: Differenz von a u. b	Kontrollversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Kontrollversuch: Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	1,89	0,2780	0,2295	0,33	0,0485
48	3,10	0,4560	0,4192	0,25	0,0368
72	3,55	0,5222	0,4648	0,39	0,0574
96	4,14	0,6090	0,5266	0,56	0,0824
120	3,85	0,5663	0,5001	0,45	0,0662
144	4,11	0,6046	0,5237	0,55	0,0809

$P_H = 7$.

Zeitdauer St.	Hauptversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Hauptversuch: Cholinmenge (a)	Hauptversuch: Differenz von a u. b	Kontrollversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Kontrollversuch: Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	1,72	0,2530	0,2147	0,26	0,0383
48	1,99	0,2927	0,2662	0,18	0,0265
72	3,39	0,4987	0,4237	0,51	0,0750
96	3,11	0,4575	0,3825	0,51	0,0750
120	3,46	0,5110	0,4345	0,52	0,0765
144	3,62	0,5325	0,4236	0,74	0,1089

$P_H = 8$.

Zeitdauer St.	Hauptversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Hauptversuch: Cholinmenge (a)	Hauptversuch: Differenz von a u. b	Kontrollversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Kontrollversuch: Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	1,41	0,2075	0,1707	0,25	0,0368
48	1,66	0,2442	0,2177	0,18	0,0265
72	2,63	0,3856	0,3312	0,37	0,0544
96	2,60	0,3825	0,3104	0,49	0,0721
120	2,55	0,3751	0,3148	0,41	0,0603
144	2,60	0,3825	0,3089	0,50	0,0736

Tabelle II.
(Pufferlösung nach Clark und Lubs)

PH = 3.

Zeitdauer St.	Hauptversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Hauptversuch: Cholinmenge (a)	Hauptversuch: Differenz von a u. b	Kontrollversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Kontrollversuch: Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	0,84	0,1236	0,0751	0.33	0,0485
48	1,08	0,1593	0,1005	0,40	0,0588
72	1,50	0,2207	0,1545	0,45	0,0662
96	1,31	0,1926	0,1014	0,62	0,0912
120	1,87	0,2751	0,2015	0,50	0,0736
144	1,85	0,2721	0,1927	0,54	0,0794

PH = 4.

Zeitdauer St.	Hauptversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Hauptversuch: Cholinmenge (a)	Hauptversuch: Differenz von a u. b	Kontrollversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Kontrollversuch: Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	3,87	0,5693	0,4943	0,51	0,0750
48	5,43	0,7988	0,7032	0,65	0,0956
72	6,34	0,9326	0,8354	0,66	0,0971
97	6,43	0,9455	0,8116	0,91	0,1339
120	6,40	0,9567	0,7861	1,16	0,1706
144	6,59	0,9695	0,8150	1,05	0,1545

PH = 5.

Zeitdauer St.	Hauptversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Hauptversuch: Cholinmenge (a)	Hauptversuch: Differenz von a u. b	Kontrollversuch: Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Kontrollversuch: Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	2,41	0 3545	0,2912	0,43	0,0633
48	3,49	0,5134	0,4403	0,50	0,0731
72	4,65	0,6825	0,5972	0,58	0,0853
96	5,09	0,7487	0,6546	0,64	0,0941
120	4,74	0,6963	0,6169	0,54	0,0794
144	4,77	0,7017	0,6090	0,63	0,0927

PH = 6.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	2,13	0,3134	0,2604	0,36	0,0530
48	3,28	0,4825	0,4266	0,38	0,0559
72	3,83	0,5634	0,5016	0,42	0.0618
96	3,73	0,5487	0,4604	0,60	0,0883
120	3,85	0,5663	0,4927	0,50	0,0736
144	3,93	0,5778	0,5028	0,51	0,0750

PH = 7.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	1,69	0,2496	0,1981	0,35	0,0515
48	1,98	0,2913	0,2530	0,26	0,0383
72	3,28	0,4825	0,4310	0,35	0,0515
96	3,69	0,5428	0,4766	0,45	0,0662
120	3,35	0,4928	0,4369	0,38	0,0559
144	3,38	0,4972	0.4310	0,45	0,0662

PH = 8.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 1,0895)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	1,28	0,1883	0,1427	0,31	0,0456
48	1,80	0,2648	0,2192	0,31	0,0456
72	2,45	0,3604	0,3020	0,39	0,0584
96	2,58	0,3794	0,3088	0,48	0,0706
120	2,37	0,3486	0,2839	0,44	0,0647
144	2,66	0,3903	0,3167	0,50	0,0736

Den obigen Resultaten nach zeigte das durch die Takadiastase aus Lecithin befreite Cholin bei PH 4 den höchsten Wert.

Um das Optimal-PH noch genauer zu bestimmen, stellte ich weiter nach Clark und Lubs und nach Sörensen die 3 Pufferlösungen: PH 3,5, 4,0 und 4,5 her. Experiment wurde verfolgt ganz gleich wie oben.

pH	Sörensen		pH	Clark und Lubs (Jedes mit Wasser auf 20 ccm aufgefüllt)	
		ccm			ccm
3,4	m/10 sekundär. Na-Citrat	9,00	3,5	m/5 Kaliumbiphthalat	5,00
	m/10 HCl	11,00		m/5 HCl	0,79
3,95	m/10 sekundär. Na-Citrat	11,00	4,0	m/5 Kaliumbiphthalat	5,00
	m/10 HCl	9,00		m/5 NaOH	0,04
4,45	m/10 sekundär. Na-Citrat	14,00	4,5	m/5 Kaliumbiphthalat	5,00
	m/10 HCl	6,00		m/5 NaOH	0,98

Die folgenden Tabelle III. u. IV. zeigen die Resultate.

Die folgende Figur zeigt die Resultate bei PH 4 und 4,5 und zwar wurde durch das Mittel des Werts von den beiden Experimenten mittels der Pufferlösung nach Sörensen und nach Clarks und Lubs gezeichnet.

TABELLE III.

PH = 3,5. (Pufferlösung nach Sörensen)

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	2,13	0,2768	0.2066	0,54	0,0702
48	3,49	0,4523	0,4199	0,25	0,0324
72	4,69	0,6089	0,5468	0,48	0,0621
96	4,66	0,6048	0,5673	0,52	0,0675
120	5,09	0,6602	0,5697	0,70	0,0905
144	5,12	0,6615	0,5724	0,66	0,0891

$P_H = 4{,}0$.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	5,35	0,6939	0,6264	0,52	0,0675
48	6,20	0,8046	0,7533	0,39	0,0513
72	7,06	0,9153	0,8329	0,63	0,0824
96	7,27	0,8423	0,8599	0,63	0,0824
120	6,93	0,8991	0,8208	0.62	0,0783
144	7,54	0,9774	0,8856	0,71	0,0918

$P_H = 4{,}5$.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	4,52	0,5859	0,5170	0,53	0,0689
48	5,41	0,7155	0,6601	0,43	0,0554
72	6,01	0,7911	0,7074	0,65	0,0837
96	6 63	0,8600	0,7776	0,63	0,0824
120	6,38	0,8276	0,7582	0,61	0,0794
144	6,66	0,8640	0,7816	0,64	0,0824

Tabelle IV.

(Pufferlösung nach Clark u. Lubs)

$P_H = 3{,}5$.

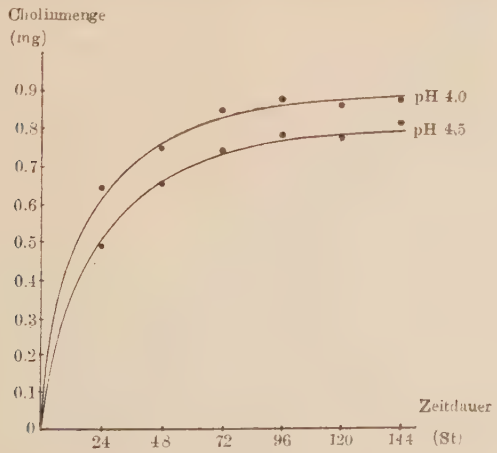
Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	2,29	0,2970	0.2227	0,57	0,0743
48	3,55	0,4604	0,4253	0,27	0,0351
72	4,89	0 6345	0.5959	0,38	0,0486
96	5,17	0,6710	0,5778	0,72	0,0932
120	5,19	0,6737	0,5805	0,72	0,0932
144	5,21	0,6750	0,6021	0,56	0,0729

PH = 4,0.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	5,56	0,7209	0,6493	0,55	0,0716
48	6,20	0,8046	0 7398	0,50	0,0648
72	7,30	0,9464	0,8559	0,70	0,0905
96	7,56	0,9801	0,9004	0,61	0,0797
120	7.56	0,9801	0,9045	0,58	0,0756
144	7,42	0,9626	0,8775	0,66	0,0851

PH = 4,5.

Zeitdauer St.	Hauptversuch			Kontrollversuch	
	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (a)	Differenz von a u. b	Benötigte $n/100$ $Na_2S_2O_3$ Lösung (F = 0,9605)	Cholinmenge (b)
	ccm	mg	mg	ccm	mg
24	4,12	0,5346	0,4549	0,61	0,0797
48	5,22	0,6763	0,6250	0,40	0,0513
72	6,70	0,8694	0,7762	0,72	0,0932
96	6,63	0,8600	0,7790	0,62	0,0810
120	6,63	0,8600	0,7952	0,50	0,0648
144	6,94	0,9001	0,8453	0,50	0,0648



Nach diesen Resultaten kann man feststellen, dass die Fähigkeit der Takadiastase, aus dem Lecithin das Cholin abtrennen zu lassen, bei P_H 4 am stärksten ist.

Schluss.

Die Spaltung des nach Sueyoshi's Methode dargestellten Lecithins durch die Takadiastase wurde durch die Bestimmung der Cholinmenge unter den verschiedenen Konzentrationen des Wasserstoff-Ions beobachtet und es wurde gewiss, dass die Cholinmenge bei P_H 4 den höchsten Wert erreichte.

LITERATUR.

Akamatsu (1923): Biochem. Z., **142**, 186.
Roman (1930): Biochem. Z., **219**, 218.
Sakakibara u. Yosinaga (1936): J. Biochem., **23**, 2, 211.
Sueyoshi (1931): J. Biochem., **13**, 145.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

DAS ANTIGEN DER WASSERMANN'SCHEN REAKTION.

Von

IHOE SAKAKIBARA.

(Aus dem Biochemischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. S. Kato) und dem Mikrobiologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. T. Ohtawara) der Medizinischen Akademie Kumamoto.)

(Eingegangen am 15. Mai 1936)

Vorwort.

Landsteiner, Müller und Pötzl (1907) erklärten, dass der alkoholische Herzextrakt von Meerschweinchen und Rindern als Antigen der Wassermann'schen Reaktion statt des wässerigen Extraktes der Leber syphilitischer Embryos brauchbar sei. Fleischmann (1908) brauchte auch als Antigen der Wassermann'schen Reaktion wässerigen Extrakt von normaler menschlicher Leber. Nachdem nun offenbar ist, dass nichtsyphilitische Organextrakte als Antigen der Wassermann'schen Reaktion angesehen werden können, wird auch die Annahme, dass die Wassermann'sche Reaktion die bei der als Immunantigen geltenden Spirochäta pallida selbst hervortretende spezifische Reaktion sei, hinfällig. Aber mit der Weil- und Braun'schen Autolipoid-Antikörper-Theorie (1909), nach der bei der Syphilis durch die Veränderungen der Gewebslipoide (disponibel-machen) Antikörper entstehen, stimmten viele andere Forscher überein.

Andererseits erklärten Sachs und Rondoni (1908), Friedemann (1910), und Schmidt (1911) die Wassermann'sche Reaktion nicht als Antigen-Antikörper-Reaktion, sondern als Störung der Komplementbindung durch die physikalisch-chemischen Veränderungen, welche durch die Reaktion zwischen der als Antigen gebrauchten Kolloidallösung und dem Serum vor sich gehen; danach ist die Wassermann'sche Reaktion eine sogenannte kolloidchemische Reaktion.

Seit Forssmann (1911) das heterogene Antigen und die Antikörper entdeckt hat, haben viele Forscher Untersuchungen über das Lipoidantigen und die Lipoidantikörper aufgestellt. Taniguchi (1920) hat berichtet, dass das Antigen der Wassermann'schen und das der Forssmann'schen Reaktion Lipoide sein, dass beide die Komplementbindungs- und Fällungsreaktion zeigen, und dass die physikalischen Eigenschaften der als Antigen gebrauchten Emulsion und der Einfluss des Cholesterinzusatzes bei beiden ähnlich seien. Weiter teilt er über den Entstehungsprozess des Antikörpers mit, dass als pathologisches Zerstörungsprodukt der Gewebe ein verartetes Lipoid entstehen und dass dies sich mit dem Eiweiss des Körpers verbinden und wohl zum Autoantigen werden kann. Ferner gab Landsteiner u. Simms (1923) bekannt, dass in mit der Mischung von alkoholischem Pferdenierenextrakt und Serum des Schweins immunisiertem Kaninchenserum sowohl die Forssmann'schen Antikörper wie auch die für die beiden Substanzen vorhanden waren. Sachs, Klopstock und Weil (1925) immunisierten die Kaninchen mit einer Mischung von Lipoiden der Kaninchenniere und des Schweineserums und stellte im Kaninchenserum Antikörper für die Lipoiden fest und sie dachten, dass man mit arteigenen Lipoide die Antikörper bilden lassen könne, wenn man irgendeine treffende Methode wählt, und dass man unter Umständen mit dem Handelspräparat des Lecithins auch den Antikörper bilden lassen könne; sie stimmen also auch mit der Weil- und Braun'schen Autoantigen-Antikörper-Theorie überein. Torii (1928) hat die alkoholischen Auszüge aus Hühnereigelb, Hirn, Hoden, Herz, Leber oder Niere des Kaninchens mit Schweineserum gemischt, mit diesen Mischungen die Kaninchen immunisiert und in allen Seren positive Wassermann'sche Reaktion gewonnen. Er hat ferner mit einer Mischung aus kultivierter Spirochäta und Lipoiden die Kaninchen immunisiert, doch zeigte sich keine Wassermann'sche Reaktion; er hat aber durch Immunisierung mit einer Mischung von kultivierter Spirochäta und Schweineserum eine positive Wassermann'sche Reaktion erzielt. Diese obigen Tatsachen erklärt er, wie folgt: Der Entstehungsprozess des Reagens der Wassermann'schen Reaktion ist so, wie durch das

Eiweiss der Spirochäta die Entstehungskraft der Lipoidantikörper zu den Organlipoiden nicht zugegeben ist, sondern die Organlipoide ihren Zustand zur bequemen Entstehung der Lipoidantikörper verändern; also scheint die Spirochäta das Organ so zu zerstören, wie ihm die Entstehungskraft der Lipoidantikörper zugefügt werden kann.

Es ist interessant, dass Matsuura (1927) berichtet hat, mit der aus dem in Benzol löslichen Teil des Cadmiumchloridsalzes der lecithinartigen Substanz aus dem Rinderherz gewonnenen Substanz (N:P=2:1) Kaninchen immunisiert und positive Wassermann'sche Reaktion festgestellt zu haben. Nakamura (1928) immunisierte mit der Mischung von Alkoholextrakt des arteigenen Organs oder des roten Blutkörperchens und heterogenen Serums z. B. Schweineserums die Kaninchen und auch mit der Mischung von Lecithin und Menschen- oder Pferdeserum. Bei allen so immunisierten Kaninchenseren gewann er mit den Organextrakten oder Lecithin als Antigen die possitive Komplementbindungsreaktion und bewies die Entstehung des Antikörpers für die Lipoide. Brandt, Guth und Müller (1926), Heimann nud Steinfeld (1928), Witebsky und Steinfeld (1928), Plaut und Kassowitz (1928), Sakamoto (1929) haben dieselben Untersuchungen mit ähnlichen Resultaten gemacht.

Wenn man nun alle Berichte durchgeht, sieht man, dass sie alle hauptsächlich über die Lipoide schreiben, und es gibt keinen Bericht, der verneint, dass das die positive Wassermann'sche Reaktion hervorrufende Immunantigen (besonders das Hapten) bei allen die Lipoide waren. Daher waren fast alle bei der Wassermann'schen Reaktion als Antigen der Reaktion gebrauchten Substanzen die Lipoide.

Hieraus wurde mir bekannt, welch interessante Rolle die Lipoide bei der Wassermann'schen Reaktion spielen. Ich habe vor kurzem schon die Forschung über die Serumreaktion der Lepra begonnen und erklärt, dass die mit Lepraserum die Komplementbindungsreaktion und die Fällungsreaktion zeigende Substanz das Kephalin, besonders das β-Kephalin sei [Sakakibara (1936 a und b)].

Hier habe ich nun, um klarzustellen, welche Lipoide bei Syphilis immunologisch-serologisch die wichtigsten sind, Forschungen unternommen. Vorerst habe ich das zur Wassermann'schen Reaktion gebrauchte Antigen studiert und veröffentliche hier nun die interssanten Resultate.

Experimente.

Methode: Die Wassermann'sche Reaktion wurde durch das Citron'sche Verfahren hervorgerufen. Über die anderen Versuchmethoden wird einzeln später beschrieben.

Materialien: Das Syphilisserum bekam ich aus der Klinik unserer Akademie und das Lepraserum von den Kranken des Tairoin-Leprasorium in Kumamoto.

Das Standardantigen, welches von Dr. Takeshima hergestellt und in der Klinik unserer Akademie verwendet wurde, war die Mischung von alkoholischem Rinderherzextrakt und 1% alkoholischer Cholesterinlösung (im Verhältnis von 10:1).

I. Analyse des Antigens der Wassermann'schen Reaktion.

Um die in dem als Antigen der Wassermann'schen Reaktion gebrauchten Standardantigen enthaltenen Substanzen und deren Mengen festzustellen, habe ich folgende Experimente ausgeführt:

a) Cholesterin.

0,5 ccm Standardantigen wurde konzentriert, mit Äther extrahiert, die Ätherlösung konzentriert und getrocknet. Der Rückstand wurde in Petrol-Äther aufgelöst, die unlöslichen Substanzen entfernt, die Lösung konzentriert und getrocknet und der Rückstand in heissem Aceton aufgelöst. Das Aceton wurde mehrere Male erneut und alle in Aceton löslichen Substanzen gesammelt; dieser Acetonlösung fügte man 1% alkoholische Digitoninlösung bei und die entstandene Cholesterindigitonidfällung wurde gewaschen, getrocknet und gewogen. Es ergab 0,00210 g, was einer Cholesterinmenge von 0,0008227 g entspricht, die das in 0,5 ccm Standardantigen enthaltene freie Cholesterin ist.

Darauf liess man 0,5 ccm Standardantigen in Natriumalkoholat verseifen, extrahierte mit Petrol-Äther, filtrierte, konzentrierte das Filtrat, extrahierte den Rückstand mit Aceton und gab dann wie vorher Digitoninlösung bei; das gewonnene Cholesterindigitonid betrug 0,00210 g, was der Cholesterinmenge von 0,0008638 g entspricht; und diese Menge ist die des Gesamtcholesterins (0,173%). Bei der Herstellung des Antigens wurde also 0,000455 g freies Cholesterin beigemischt; daher ist in 0,5 ccm alkoholischem Rinderherzextrakt 0,0003677 g freies Cholesterin und 0,0000411 g Cholesterinester enthalten.

b) Phosphatide.

Die in 0,5 ccm Standardantigen enthaltenen in Äther löslichen Substanzen wurden nach Neumann's Methode verascht, und nach Iversen's Methode (1920) die Phosphormenge festgestellt. Die Menge des zum Auflösen des phosphormolybdänsauren Ammosiums nötigen $n/25$ NaOH war 1,94 ccm, was einer Phosphormenge von 0,08633 mg entspricht.

Der Stickstoff der ätherlöslichen Substanzen in 2,0 ccm Antigen wurde nach Mikro-Kjeldahl festgestellt. Die Menge des zum Neutralisieren des Ammoniaks nötigen $n/100$ H_2SO_4 war 1,61 ccm, was 0,22276 mg N entspricht; in 0,5 ccm Antigen ist also 0,05569 mg Gesamt-N enthalten.

Der Amino-N der in 1,0 ccm Antigen ätherlöslichen Substanzen wurde nach Van Slyke's Methode bestimmt.

Bei 27° und 762 mm Druck gewann man 0,05 ccm N, also 0,027525 mg; daher ist in 0,5 ccm Material 0,01376 mg Amino-N enthalten.

Die obigen Analysenresultate des Standardantigens, kurz zusammengefasst, sieht man auf Tabelle I.

II. Die Mischungen von rein dargestellten verschiedenen Lipoiden als Antigen.

Da man durch die vorigen Experimente die Lipoidmenge des Standardantigens feststellen konnte, habe ich 0,324 g Lecithin, 0,108 g Kephalin, 0,173 g Cholesterin und 100 ccm Alkohol gemischt

Tabelle I.

in 5 ccm Standardantigen

Cholesterinmenge	freie	0,8227 mg	
	gebundene	0,0411 „	
	gesamte	0,8638 „	(0,173%)
	künstlich gesetzte	0,4550 „	
Phosphatidemenge		0,08633 „	
Gesamt-Nmenge		0,05569 „	
Amino-Nmenge		0,01376 „	
P : N		1 : 1,428	
Gesamt-N : Amino-N		100 : 25	
Gesamt Phosphatidmenge		ca. 2,2 mg	(0,43%)
Lecithinmenge		„ 1,6 „	(0,32 „)
Kephalinmenge		„ 0,5 „	(0,11 „)

und die Antigenität dieser Mischung geprüft. Dieses Gemisch hat dieselbe Proportion der Lipoide wie das Standardantigen; mit diesem Gemisch probierte man beim Syphilisserum eine Komplementbindungsreaktion hervorzurufen und verglich diese mit der des Standardantigens. Das hierfür verwendete Lecithin war das nach Sueyoshi's Methode (1931) aus Eigeb hergestellte. Das Kephalin war nach Levene und Rolf (1919) aus Rinderhirn hergestellt. Amino-N/Gesamt-N in diesem Kephalin war 96/100. Das Cholesterin war nach Rosenheim's Methode (1906) aus Rinderhirn hergestellt und sein Schmelzpunkt war 147,5°.

Da die grösste Menge der Lipoidmischung, welche die komplementhemmende Wirkung nicht zeigte, 0,015 ccm war, wurde die Stammlösung 60 fach und das Standardantigen 7 fach verdünnt und je 0,5 ccm gebraucht. Das Resultat ist auf Tabelle 2 gezeigt.

Man ersieht daraus, dass beim Syphilisserum das Standardantigen stark positiv, während bei fast allen Fällen die Lipoidmischung negativ reagierte, dass es jedoch im Gegensatz dazu für das Lepraserum vielfach positiv war. Das kommt daher, dass ausser dem Lecithin auch eine kleine Menge Kephalin enthalten war.

Es lässt sich bei der Betrachtung der Fälle, die für das Syphilisserum nicht positiv waren, nicht sofort feststellen, ob dies daher kommt, dass die Substanzen ausser dem Kephalin, Lecithin

und Cholesterin des Rinderherzens die Antigenität besitzen und ob die Antigenität der Lipoide je nach dem Organ verschieden ist.

Tabelle II.

Kranke	Krankheit	Antigen	Serummenge					
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	Kontr.
T.N.	Syph.	W. st.	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		Gem. Lip.	±	—	—	—	—	—
E.I.	„	W. st.	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
M.O.	„	W. st.	+ + +	+ +	+	—	—	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
D.T.	„	W. st.	+ + +	+ + +	+ +	—	—	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
N.T.	„	W. st.	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
O.F.	„	W. st.	+ + +	+ +	+	—	—	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
S.K.	„	W. st.	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
N.T.	L.T.	W. st.	±	—	—	—	—	—
		Gem. Lip.	+ + +	+ +	+	—	—	—
N.M.	„	W. st.	—	—	—	—	—	—
		Gem. Lip.	+ + +	+ +	+ +	+	—	—
D.S.	„	W. st.	+ +	+	—	—	—	—
		Gem. Lip.	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
Y.K.	„	W. st.	—	—	—	—	—	—
		Gem. Lip.	—	—	—	—	—	—
N.F.	„	W. st.	—	—	—	—	—	—
		Gem. Lip.	±	—	—	—	—	—

Syph. = Syphilis L.T. = Lepra tuberosa
W.st. = Wasserman-Standardantigen
Gem.Lip. = gemischte Lipoide

III. Trennung der im Standardantigen enthaltenden Substanzen.

Da wie oben die Lipoidmischung keine Antigenität für das Syphilisserum zeigte, trennte ich die verschiedenen Substanzen im Standardantigen und prüfte die Antigenität der einzelnen Substanzen.

Es ist bekannt, dass die wichtigste Substanz im Standardantigen nicht das Cholesterin, sondern der Alkoholische Rinderherzextrakt ist; daher habe ich 365 g Rinderherzmuskeln mit fünffachem reinem Alkohol extrahiert und vom Extrakt die verschiedenen Substanzen getrennt. Der alkoholische Rinderherzmuskel-Extrakt wurde im Vakuum konzentriert; es ergab sich gelblicher Rückstand und 40 ccm gelbliche wässerige Lösung. Dieser Mischung gab man Petroläther bei, schüttelte, sammelte alle in Petroläther löslichen Substanzen, konzentrierte sie, löste sie noch einmal in Petroläther auf, filtrierte und konzentrierte das Filtrat. Hierauf löste man dies wieder in Äther auf, filtrierte, konzentrierte und trennte mit absolutem Alkohol in einen in Alkohol löslichen Teil und einen in Alkohol unlöslichen Teil. Das Lecithin wurde noch weiter nach Sueyoshi's (1931), das Kephalin nach Levene und Rolf's Methode (1919) möglichst gut gereinigt, und während des Verfahrens wurde mit Tierkohle der gelbliche Farbstoff möglichst entfernt. Bei 0,01 g des auf diese Weise gewonnenen Lecithins war Amino-N/Gesamt-N = 6/100. Die Phosphormenge in 0,01 g Lecithin war 0,400945 mg, also war N/P = 1,01/1,000. Bei 0,01 g Kephalin war Amino-N/Gesamt-N = 0,1707/0,1806 = 95/100. Bei 0,01 g Kephalin wurde 0,4183 mg Phosphor festgestellt, daher war N/P = 1,04/1,00.

Aus der bei der Herstellung der Lipoide gewonnenen Acetonlösung wurde nach Rosenheim's Methode Cholesterin hergestellt, dann wurde öfters mit Tierkohle entfärbt, mit Alkohol rekristallisiert; ausser dem Cholesterin wurden auch noch etwas Cholesterin enthaltende, in Aceton lösliche gelbe farbstoffartige Substanzen im Vakuum konzentriert und getrocknet.

Der im Wasser lösliche Teil des alkoholischen Rinderherzextraktes wurde 24 Stunden in dem Kumagawa-Sutoschen Flüssigkeitsextraktionsapparat mit Äther extrahiert und die in Äther löslichen Teile entfernt.

Mit den obigen verschiedenen getrennten Substanzen wurden folgende 5 Arten von Lösungen hergestellt, ihre serologischen Eigenschaften untersucht und mit dem Standardantigen verglichen.

1) 0,5% alkoholische Lecithinlösung,

2) 0,5% Kephalin-physiologische Kochsalzlösung,
3) 0,1% alkoholische Cholesterinlösung,
4) 0,5% alkoholische Lösung von in Aceton löslichen Substanzen,
5) auf ein Drittel konzentrierte wässerige Lösung der in Wasser löslichen Substanzen.

Das Resultat ist in Tabelle III gezeigt.

Tabelle III.

Hämolyse.

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,01625	0,0083125	Kontr. (NaCl)
Arten der Antigene	1) Rinderherz-lecithin	+ +	±	–	–	–	–	–	–
	2) Rinderherz-kephalin	–	–	–	–	–	–	–	–
	3) Rinderherz-cholesterin	–	–	–	–	–	–	–	–
	4) In Aceton löslicher Teil	+ +	±	–	–	–	–	–	–
	5) In Wasser löslicher Teil	–	–	–	–	–	–	–	–
	6) Standard-antigen	+	+	–	–	–	–	–	–

Wie man aus Tabelle III ersieht, war die Hämolyse des Kephalins, Cholesterins und der in Wasser löslichen Teile bei 0,5 ccm vollkommen negativ und bei dem Lecithin und in Aceton löslichem Teile bei 0,5 ccm, welche vierfach verdünnt waren, war sie überhaupt nicht vorhanden, genau wie beim Standardantigen. Bei den in Alkohol gelösten Substanzen änderte sich die Farbe und entstand eine Fällung, man konnte jedoch unterscheiden, ob eine Hämolyse vorhanden war oder nicht.

Nach Tabelle IV zeigt nur das Lecithin im alkoholischen Rinderherzextrakt im gleichen Grad wie das Standardantigen Antigenität, die anderen Substanezn zeigen für das Syphilisserum keine Antigenität. Die Menge dieser Substanzen, welche für

Gebrauch als Antigen geeignet ist, wurde durch die komplementhemmende Wirkung bestimmt; von der achtfach verdünnten Lecithinlösung, der zehnfach verdünnten Kephalinlösung, der fünffach verdünnten Cholesterinlösung und den zwanzigfach verdünnten Lösungen der in Aceton und Wasser löslichen Teile nahm man je 0,5 ccm und prüfte die Komplementbindungsreaktion.

Tabelle IV.

Komplementhemmende Wirkung.

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,3	0,2	0,15	0,1	0,05	0,02	0,01	Kont.
Arten der Antigene	1) Rinderherz-lecithin	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2) Rinderherz-kephalin	–	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	3) Rinderherz-cholesterin	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4) In Aceton löslicher Teil	–	+	++	++	+++	+++	+++	+++
	5) In Wasser löslicher Teil	–	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6) Standard-antigen	–	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Antigenität (0,1 ccm Serum von Kranken M.H., W–R +++)

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,15	0.1	0,075	0,05	0,037	0,02	0,014	Kontr.
Arten der Antigene	1) Rinderherz-lecithin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
	2) Rinderherz-kephalin	++	++	±	–	–	–	–	–
	3) Rinderherz-cholesterin	±	–	–	–	–	–	–	–
	4) In Aceton löslicher Teil	+++	++	±	–	–	–	–	–
	5) In Wasser löslicher Teil	++	+	–	–	–	–	–	–
	6) Standard-antigen	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	–

Tabelle V. (a)

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0.025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
T.I.	Syph.	1	+++	+++	++	+	–	–	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+++	++	+	+	–	–	–
D.M.	„	1	+++	+++	+++	++	+	–	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+++	+++	+++	+++	++	–	–
D.T.	„	1	+++	+++	+++	+++	++	+	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+++	+++	+++	++	++	+	–
N.T.	„	1	+++	+++	++	+	–	–	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+++	++	+	+	–	–	–

Tabelle V. (b)

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
T.I.	Syph.	1	+++	+++	+++	++	+	+	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+++	+++	+++	+++	++	+	–
E.I.	„	1	+++	++	+	–	–	–	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+++	+++	+	–	–	–	–
N.T. (W–R +)	L.T.	1	±	±	–	–	–	–	–
		2	+++	++	++	+	+	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+	–	–	–	–	–	–
B.T. (W–R –)	„	1	–	–	–	–	–	–	–
		2	+++	+++	+++	++	+	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	–	–	–	–	–	–	–

N.T. (W–R –)	L.T.	1	–	–	–	–	–	–	–
		2	+ +	+	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	–	–	–	–	–	–	–
D.S (W–R#)	L.T.	1	+ +	+	–	–	–	–	–
		2	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+ +	+ +	+	–	–	–	–
G.H. (W–R + + +)	L.T.	1	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		2	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	+ + +	+ +	+ +	+	–	–	–
D.K.	G.	1	–	–	–	–	–	–	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	–	–	–	–	–	–	–
M.M.	„	1	–	–	–	–	–	–	–
		2	–	–	–	–	–	–	–
		3	–	–	–	–	–	–	–
		4	–	–	–	–	–	–	–
		5	–	–	–	–	–	–	–
		6	–	–	–	–	–	–	–

Tabelle V. (c)

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
J.T.	G.	1	—	—	—	—	—	—	—
		2	—	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—	—
		4	—	—	—	—	—	—	—
		5	—	—	—	—	—	—	—
		6	—	—	—	—	—	—	—
K.M.	„	1	—	—	—	—	—	—	—
		2	—	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—	—
		4	—	—	—	—	—	—	—
		5	—	—	—	—	—	—	—
		6	—	—	—	—	—	—	—

G. = Gesunden L.T. = Lepra tuberosa W–R = Wassermann-Reaktion

Wie die Resultate der Tabelle V zeigen, war das Rinderherz-Lecithin für das Syphilisserum positiv und stimmte überein mit dem Standardantigen; von den anderen Antigenen war das Kephalin für das Lepraserum positiv, die anderen alle negativ. In dem durch Standardantigen positiven Lepraserum zeigt das Rinderherz-Lecithin im gleichen Grad Positivität. Doch waren alle Antigene für das Gesundenserum negativ.

Den obigen Resultaten entsprechend kann man sagen, dass die Hauptsubstanz des Antigens der Wassermann'schen Reaktion, also der Mischung von Cholesterin und alkoholischem Rinderherzextrakt das im Antigen enthaltene Lecithin ist.

IV. Über die Antigenität des aus verschiedenen Geweben gewonnenen Lecithins.

Ich habe ausser dem aus Rinderherz gewonnenen Lecithin, das aus Rinderhirn, Hühnereigelb, Rinderleber, -niere und -milz nach Sueyoshi's Methode (1931) hergestellt und gereinigt. Dann habe ich 75 g Rinderpankreas mit Alkohol extrahiert und versucht, aus dem Rückstand des konzentrierten Extraktes Lecithin zu gewinnen, was jedoch sehr schwer war, weshalb ich vom Rinderpankreas den Rückstand des konzentrierten Alkoholextraktes verwendete. Ausser diesen habe ich noch das Sankyo-Lecithin genommen, also zusammen 8 Arten, bei ihnen die Antigenität geprüft und mit dem Standardantigen verglichen.

Von allen Lecithinarten nahm ich 0,5% und von dem alkoholischen Rinderpankreasextrakt eine 1% alkoholische Lösung, prüfte die komplementhemmende Wirkung und die Antigenität, deren Resultate in Tabelle VI gezeigt sind. Die Rinderherz-Lecithinlösung zeigte schon bei 0,15 ccm keine komplementhemmende Wirkung und war auch bei 0,01 ccm für das Syphilisserum positiv, erwies also eine gleiche Antigenität wie das Standardantigen. Die Rinderleber-Lecithinlösung zeigte schon bei 0,1 ccm keine komplementhemmende Wirkung mehr und war schon bei 0,02 ccm positiv für das Syphilisserum; sie kam mit ihrer Antigenität gleich nach dem Rinderherz-Lecithin. Die Rindernieren-Lecithinlösung ergab bei 0,07 ccm keine komplementhemmende Wirkung mehr und war

bei 0,05 ccm für das Syphilisserum positiv; man konnte also noch eine geringe Antigenität feststellen. Alle anderen Lecithine und der alkoholische Rinderpankreasextrakt waren bei einer Menge, die keine komplementhemmende Wirkung zeigte, auch auf das Syphilisserum negativ und bewiesen wohl auch keine Antigenität.

Tabelle VI.

Antigenität (0,1 ccm Syphilisserum von G. E.)

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,15	0,1	0,075	0,05	0,035	0,02	0,01	Kontr.
Arten der Antigene	1) Rinderherzlecithin	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–
	2) Rinderhirnlecithin	+ + +	–	–	–	–	–	–	–
	3) Rinderleberlecithin	+ + +	+ +	+ +	+	+	+	–	–
	4) Rindernierenlecithin	+ + +	+ +	+	+	–	–	–	–
	5) Rindermilzlecithin	+ + +	+	–	–	–	–	–	–
	6) Rinderpankreasextrakt	+	+	–	–	–	–	–	–
	7) Hühnereigelblecithin	+	–	–	–	–	–	–	–
	8) Sankyolecithin	+	±	–	–	–	–	–	–
	9) Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–

Komplementhemmende Wirkung.

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,3	0,2	0,15	0,1	0,075	0,05	0,02	Kontr.
Arten der Antigene	1) Rinderherzlecithin	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	2) Rinderhirnlecithin	–	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	3) Rinderleberlecithin	–	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	4) Rindernierenlecithin	–	–	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	5) Rindermilzlecithin	–	–	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	6) Rinderpankreasextrakt	–	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	7) Hühnereigelblecithin	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	8) Sankyolecithin	–	+	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	9) Standardantigen	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Nach den Vorexperimenten wurde die Rinderherz-Lecithinlösung und das Standardantigen siebenfach, die Rinderleber-, Rindermilz und Eigelb-Lecithinlösungen zehnfach, die Rinderhirn-, Rindernieren- und Sankyo-Eigelb-Lecithinlösungen sowie der alkoholische Rinderpankreasextrakt vierzehnfach verdünnt und von jeder Lösung 0,5 ccm gebraucht. Die Resultate der geprüften Komplementbindungsreaktion sind in Tabelle VII gezeigt.

Tabelle VII.

Kranke	Antigen (Lecithin)	Serummenge						
		0,1	0,05	0,025	0,125	0,00625	0,003125	Kontr.
N.T. Syph.	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	+ +	+	+	–	–	–	–
	Rindernieren L.	+	–	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	±	–	–	–	–	–	–
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ +	+ +	–	–	–
K.A. Syph.	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	+ + +	+ +	+	+	–	–	–
	Rindernieren L.	+	+	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	–	–	–	–	–	–	–
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+	–
N.Y. Syph.	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	+ +	+ +	+	–	–	–	–
	Rindernieren L.	+ +	+	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	–	–	–	–	–	–	–
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–

Tabelle VII.—(Fortsetzung).

Kranke	Antigen (Lecithin)	Serummenge						
		0,1	0,05	0,025	0,125	0,00625	0,003125	Kontr.
D.M. Syph.	Rinderherz L.	+ + +	+ +	+ +	+	—	—	—
	Rinderhirn L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rinderleber L.	+ +	+	+	—	—	—	—
	Rindernieren L.	+	—	—	—	—	—	—
	Rindermilz L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rinder-pankreas Ex.	—	—	—	—	—	—	—
	Hühnereigelb L.	—	—	—	—	—	—	—
	Sankyo L.	+	+	—	—	—	—	—
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
N.K. Syph.	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
	Rinderhirn L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rinderleber L.	+ +	+	—	—	—	—	—
	Rindernieren L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rindermilz L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rinder-pankreas Ex.	—	—	—	—	—	—	—
	Hühnereigelb L.	—	—	—	—	—	—	—
	Sankyo L.	—	—	—	—	—	—	—
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
S.Y. Syph.	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
	Rinderhirn L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rinderleber L.	+ + +	+ +	+	+	—	—	—
	Rindernieren L.	+ +	+	—	—	—	—	—
	Rindermilz L.	—	—	—	—	—	—	—
	Rinder-pankreas Ex.	—	—	—	—	—	—	—
	Hühnereigelb L.	—	—	—	—	—	—	—
	Sankyo L.	—	—	—	—	—	—	—
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	—
T.M. (L.T.) (W-R + + +) (K-R + +)	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+	—	—
	Rinderhirn L.	+	—	—	—	—	—	—
	Rinderleber L.	+ +	+	+	—	—	—	—
	Rindernieren L.	+	+	—	—	—	—	—
	Rindermilz L.	±	—	—	—	—	—	—
	Rinder-pankreas Ex.	+	—	—	—	—	—	—
	Hühnereigelb L.	+	+	—	—	—	—	—
	Sankyo L.	+ +	+	—	—	—	—	—
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—

Y.M. (W–R. –) (K–R + + +) (L.T.)	Rinderherz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindernieren L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	±	+	–	–	–	–	–
	Standardantigen	–	–	–	–	–	–	–
H.S. (W–R. –) (K–R. –) (L.N.)	Rinderherz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindernieren L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	–	–	–	–	–	–	–
	Standardantigen	–	–	–	–	–	–	–
H.M. (W–R + + +) (K–R + + +) (L.T.)	Rinderherz L.	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	+ +	+	–	–	–	–	–
	Rindernieren L.	+	+	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	+	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	+	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	+ +	+ +	+	–	–	–	–
	Standardantigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
Z.M. Gesunde	Rinderherz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindernieren L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	–	–	–	–	–	–	–
	Standardantigen	–	–	–	–	–	–	–
I.S. Gesunde	Rinderherz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderhirn L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinderleber L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindermilz L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rindernieren L.	–	–	–	–	–	–	–
	Rinder-pankreas Ex.	–	–	–	–	–	–	–
	Hühnereigelb L.	–	–	–	–	–	–	–
	Sankyo L.	–	–	–	–	–	–	–
	Standardantigen	–	–	–	–	–	–	–

K–R . . . . . Kephalinreaktion.

Die Rinderherz-Lecithinlösung stimmte mit dem Standardantigen ziemlich überein; die Rinderleber-Lecithinlösung zeigte eine etwas schwächere Reaktion, stimmte jedoch mit dem Standardantigen überein. Die Rindernieren-Lethinlösung war für die meisten Fälle des Syphilisserums, welches beim Standardantigen eine stark positive Reaktion zeigte, schwach positiv. Die Rinderhirn-, Rindermilz- und Eigelblecithin (selbstgemachte)-Lösungen sowie der alkoholische Rinderpankreasextrakt zeigten keine Antigenität, nur die Sankyo-Eigelb-Lecithinlösung war hie und da positiv.

Alle Lecithinarten zeigten für das Lepraserum, das beim Standardantigen positiv waren, eine gewisse Antigenität, und besonders hatte die Rinderherz-Lecithinlösung dieselbe Reaktionsstärke wie das Standardantigen. Das Sankyo-Eigelb-Lecithin zeigte für das Lepraserum, welches durch das Kephalin eine positive Reaktion zeigte, eine ziemlich stark positive Reaktion, und man muss annehmen, dass dies von dem dem Sankyo-Lecithin beigemischten Kephalin kommt.

V. Rinderherz-Lecithin mit Rinderhirn-Kephalin oder -Cholesterin.

Schon habe ich (1936, b) beim Studium der Serum-Reaktion der Lepra berichtet, dass das Antigen, welches eine spezifische Reaktion für das Leprasserum zeigt, das β-Kephalin sei und dass dieses Kephalin ca. 80% von dem im Rinderhirn enthaltenen Kephalin ausmacht, und da ich nach den obigen Resultaten nun weiss, dass die im Antigen der Wassermann'schen Reaktion enthaltene Substanz, welche gegen das Syphilisserum reagiert, das Rinderherz-Lecithin ist, habe ich beide Phosphatide gemischt und, um festzustellen, welche Beziehungen deren Proportionen auf die Serumreaktion für Syphilis und Lepra haben, folgende Experimente gemacht:

Aus 5, 4, 3, 2.5, 2 und 1 ccm 0,5% alkoholischer Rinderherz-Lecithinlösung und 0, 1, 2, 2.5, 3 und 4 ccm 0,5% ätherischer Rinderhirn-Kephalinlösung wurden 6 Mischungen gemacht. Jeder dieser Mischungen gab man physiologische Kochsalzlösung bei, um in der entstehenden 0,5 ccm-Lösung 0,3 ccm Lecithin-Kephalin-

mischung zu erhalten. Die komplementhemmende Wirkung und die Antigenität der 6 Mischungen sind in Tabelle VIII gezeigt:

Tabelle VIII.

Komplementhemmende Wirkung.

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,3	0,2	0,15	0,1	0,07	0,05	0,02	Kontr.
Antigen (L:K)	1) 5:0	—	+	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	2) 4:1	—	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	3) 3:2	—	+	+	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	4) 2,5:2,5	—	—	—	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	5) 2:3	—	—	—	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	6) 1:4	—	—	—	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +

Antigenität.

		Probierröhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
		Antigenmenge	0.15	0,1	0,07	0,05	0,037	0,02	0,001	Kontr.
0,2 ccm Syphilisserum	K.A. (W–R + + +)	Antigen (L:K) 1) 5:0	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		2) 4:1	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—
		3) 3:2	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	+	—	—
		4) 2,5:2,5	+ + +	+	—	—	—	—	—	—
		5) 2:3	+	±	—	—	—	—	—	—
		6) 1:4	±	+	—	—	—	—	—	—
	N.Y. (W–R + + +)	Antigen (L:K) 1) 5:0	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		2) 4:1	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		3) 3:2	+ + +	+ +	+ +	+	±	—	—	—
		4) 2,5:2,5	+ + +	+	—	—	—	—	—	—
		5) 2:3	+	—	—	—	—	—	—	—
		6) 1:4	+	+	—	—	—	—	—	—
0,2 ccm Leprasserum	T.M. (W–R + + +) (K–R + + +)	Antigen (L:K) 1) 5:0	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		2) 4:1	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		3) 3:2	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	—
		4) 2,5:2,5	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	—
		5) 2:3	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	—
		6) 1:4	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	—
	Y.M. (W–R —) (K–R + + +)	Antigen (L:K) 1) 5:0	+ +	+	—	—	—	—	—	—
		2) 4:1	+ +	+	+	—	—	—	—	—
		3) 3:2	+ + +	+ +	+	+	—	—	—	—
		4) 2,5:2,5	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	—
		5) 2:3	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—
		6) 1:4	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	±	—

Die komplementhemmende Wirkung der Mischung war beim Rinderhirn-Kephalin je nach der Grösse der Menge stärker; beim Rinderherz-Lecithin war die Antigenität je nach der Grösse der Menge für das Syphilisserum stärker und je nach der Grösse der Menge beim Kephalin schwächer. Beim der Mischung von Rinderherz-Lecithin und Rinderhirn-Kephalin zu gleichen Mengen zeigte sich gar keine Antigenität gegen das Syphilisserum.

Es gibt Lepraseren, bei denen sowohl die Reaktion durch Kephalin wie die Wassermann'sche Reaktion stark positiv ist. Alle Antigene zeigten gegen diese Lepraseren den gleichen positiven Reaktionsgrad. Bei dem Lepraserum, bei dem die Wassermann'sche Reaktion negativ und die Reaktion durch Kephalin positiv war, zeigte das Rinderherz-Lecithin allein keine Antigenität; die Mischung, in der ein Viertel Kephalin enthalten war, zeigte nur geringe Antigenität; mit Zunahme des Kephalins nahm auch die Stärke des Grades zu und, als es die gleiche Menge des Lecithins erreichte, wurde die Antigenität am stärksten; als die Lecithinmenge aber abnahm, wurde die Antigenität ein wenig schwächer.

Von diesen Antigenen wurde (1) siebenfach, (2) und (3) zehnfach, (4) vierzehnfach, (5) und (6) zwanzigfach verdünnt und von jeder Lösung 0,5 ccm benutzt und die Komplementbindungsreaktion auf die verschiedenen Seren geprüft.

Die Resultate sind in Tabelle IX. gezeigt und stimmen mit denen der Vorversuche ziemlich überein.

Aus den obigen Ergebnissen ersieht man, dass die Antigenität des Rinderherz-Lecithins gegen das Syphilisserum geschwächt wird, wenn man Lecithin und Kephalin mischt, dagegen wird die Antigenität für das Lepraserum immer stärker. Letzteres zeigt also eine ganz gegenteilige Wirkung wie das erstere. Daher ist man gezwungen anzunehmen, dass die Reaktion des Lepraserums und das des Syphilisserums von ganz anderer Art sind.

Hierauf wurden je 5 ccm 0,5% alkoholische Rinderherz-Lecithinlösung mit 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 2,8 cc 0,5% alkoholischer Cholesterinlösung gemischt und jeweils bis auf 20 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzt, welche Lösungen von 1–7

Tabelle IX.

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge 0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
D.H. (W–R + + +)	Syph.	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+	+	–	–	–
		3)	+ +	+	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
M.O. (W–R + + +)	Syph.	1)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		3)	+ +	+	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
T.K. (W–R + + +)	Syph.	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–	–
		2)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		3)	+	+	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
K.O. (W–R + + +)	Syph.	1)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		3)	+	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
M.S. (W–R + + +)	Syph.	1)	+ + +	+ + +	+	+	–	–	–
		2)	+ + +	+ +	+	+	–	–	–
		3)	+	+	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
T.M. (W–R + + +) (K–R + + +)	L.T.	1)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	–
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–
		5)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	–	–
N.T. (W–R –) (K–R + + +)	L.N.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	+ +	+	–	–	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		5)	+ + +	+ +	+	+	–	–	–
		6)	+ + +	+ +	+	+	–	–	–

Tabelle IX.—(Fortsetzung).

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
D.S. (W–R + + +) (K–R + + +)	L.T.	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+	+	–	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		5)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	–	–
		6)	+ + +	+ +	+ +	+	–	–	–
O.D. (W–R –) (D–R + + +)	L.T.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	±	–	–	–	–	–	–
		3)	+ +	+ +	+	+	–	–	–
		4)	+ + +	+ +	+ +	+	–	–	–
		5)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		6)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
K.I.	G.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
M.H.	G.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–

Erklärung zu den Abkürzungen
W–R + + + = Wassermann-Reaktion stark Possitiv.
K–R – = Reaktion mit Kephalin negativ.
L.T. = Lepra tuberosa.
L.N. = Lepra nervosa.
Syph. = Syphilis.
G. = Gesunde.

nummeriert wurden. Den Resultaten der Prüfung der komplementhemmenden Wirkung dieser Antigene entsprechend wurden (1), (2), und (3) 32 fach, (4), (5), (6) und (7) 64 fach verdünnt, 0,5 ccm dieser Lösungen verwendet und die Komplementbindungsreaktion geprüft.

Die Resultate sind in Tabelle X gezeigt.

Tabelle X.

Untersuchte	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
N.K.	Syph.	1)	+ + +	+ +	±	—	—	—	—
		2)	+ + +	+ +	+ +	+	—	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ +	+	—	—	—	—
		5)	+ + +	+ +	+	—	—	—	—
		6)	+ + +	+ +	+ +	+	—	—	—
		7)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		Standard Antigen	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
D.H.	„	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		5)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	—	—	—
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		7)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		Standard Antigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
D.N.	„	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		5)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	—	—	—
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		7)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		Standard Antigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
H.C.	G.	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	—	—	—	—	—	—	—
		3)	—	—	—	—	—	—	—
		4)	—	—	—	—	—	—	—
		5)	—	—	—	—	—	—	—
		6)	—	—	—	—	—	—	—
		7)	—	—	—	—	—	—	—
		Standard Antigen	—	—	—	—	—	—	—
D.O.	G.	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	—	—	—	—	—	—	—
		3)	—	—	—	—	—	—	—
		4)	—	—	—	—	—	—	—
		5)	—	—	—	—	—	—	—
		6)	—	—	—	—	—	—	—
		7)	—	—	—	—	—	—	—
		Standard Antigen	—	—	—	—	—	—	—

Die Reaktion war bei den mit Cholesterin gemischten Lösungen etwas stärker als die der Rinderherz-Lecithinlösung allein, und hier stimme ich überein mit den Berichten von Browning, Cruickshank und M'Kenzie (1910). Da die komplementhemmende Wirkung stärker wird, wenn die Cholesterinmenge mehr als die Hälfte der Lecithinmenge ausmacht, muss die zu gebrauchende Menge verringert werden; daher erscheint auch die Reaktion etwas schwächer. Jedoch zeigt von den Antigenen, die zwar in gleicher Menge gebraucht werden, dasjenige die stärkere Reaktion, wo die Cholesterinmenge grösser ist. Von diesen 7 Arten der Antigene zeigen (2), (3), (6) und (7) denselben Reaktionsgrad wie das Standardantigen. Da, wie aus den vorigen Versuchen hervorgeht, die Proportion des Lecithins zum Cholesterin im Standardantigen 173/324=53/100 ist, stimmt die von (5) und (6) damit überein.

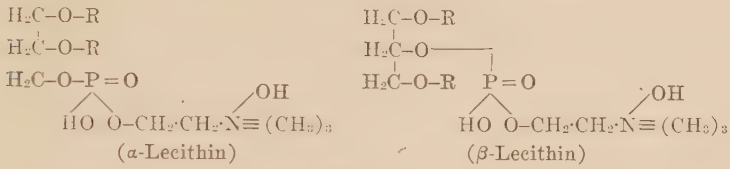
Diesen Experimenten gemäss kann man unschwer annehmen, dass der Gewebeextrakt, je nach dem Gehalt von Lecithin, Kephalin und Cholesterin im Gewebe, Antigenität zeigt oder nicht.

VI. Bau und Antigenität des Lecithins.

Wie oben erwähnt wurde, zeigt das Lecithin je nach den Geweben, in denen es enthalten ist, Unterschiede seiner serologischen Eigenschaften, besonders seiner Antigenität gegen das Syphilisserum, und es erweist sich, dass es, wenn das Lecithin mit Kephalin oder Cholesterin gemischt ist, Einfluss auf die Antigenität des Lecithins ausübt. In den Lebewesen sind verschiedene Arten von Lipoiden beisammen, und weil das Lecithin und Kephalin ähnliche chemische Eigenschaften haben, ist es klar, dass es sehr schwer ist, beim Extrahieren die einzelnen Substanzen ganz rein zu gewinnen. Auch das Lecithin, je nach den Arten der Fettsäure, ist in sehr vielen Arten vertreten, daher ist es noch schwerer, diese verschiedenen einzelnen Arten zu trennen und zu extrahieren.

Jedoch kann man das Lecithin nach seinem Bau grosszügig in 2 Arten teilen. Das Lecithin ist eine Verbindung von durch 2 Fettsäurewurzeln substituierter Glycero-Phosphorsäure und Cholin, einer organischen Base; je nach dem Unterschied der bindenden Stellung zwischen der Glycero-Phosphorsäure und den Fettsäure-

wurzeln wird das Lecithin entweder symmetrisch oder unsymmetrisch aufgebaut. Da die unsymmetrisch aufgebauten Substanzen in allgemeinen optisch aktiv sind, ist dies auch beim Lecithin der Fall. Dieses Lecithin wird α-Lecithin genannt; das symmetrisch aufgebaute Lecithin ist optisch inaktiv, es wird β-Lecithin genannt.



In letzter Zeit hat Suzuki (1930) berichtet, dass man diese beiden Arten von Lecithin je nach der Acetonlöslichkeit seines Cadmiumchloridsalzes quantitativ ziemlich voneinander trennen könne.

Hier habe ich nun, um festzustellen, ob die Antigenität des Lecithins gegen das Syphilisserum durch dessen Aufbau unterschiedlich ist, folgende Experimente gemacht.

1) Trennung des symmetrischen und unsymmetrischen Lecithins.

1 g des in Abschnitt III gebrauchten gereinigten Rinderherz-Lecithins wurde in ein wenig Alkohol aufgelöst und gesättigte alkoholische Cadmiumchloridlösung beigegeben. Die entstandene Lecithincadmiumchloridsalz-Fällung wurde mit Äther fünfmal gewaschen. Nachdem der Äther entfernt war, wurde Aceton beigegeben, in einem Wasserbad von 70° erhitzt und gut zerrührt. Die Acetonlösung wurde von der in Aceton unlöslichen Fällung getrennt, dem unlöslichen Teil wieder Aceton beigegeben und dasselbe Verfahren fünfmal wiederholt. Der in Aceton lösliche Teil wurde gesammelt, konzentriert, der Rückstand noch einmal in heissem Aceton aufgelöst, filtriert und das Filtrat konzentriert. Dem Rückstand gab man reinen Alkohol bei, zerrührte gut und machte eine Suspension, gab dieser, bis sie deutlich alkalisch wurde, pulverisiertes Ammoniumcarbonat bei und befreite so das Lecithin, welches dann wieder in reinem Alkohol aufgelöst wurde. Diese alkoholische Lösung nahm man, wusch den übrig gebliebenen Rück-

stand mit Alkohol und gab den Waschalkohol zur alkoholischen Lösung, konzentrierte, löste den Rückstand in Äther auf und reinigte dann weiter nach Sueyoshi (1931).

Die in Aceton unlöslichen Teile des Lecithincadmiumchlorids wurden dreimal in Aceton gewaschen, das Aceton entfernt, auf Alkohol schwimmen gelassen, pulverisiertes Ammoniumcarbonat beigegeben und weiter, wie oben verfahren.

Die auf diese Weise gewonnenen zwei Arten Lecithins sind das β-Lecithin und α-Lecithin (das letztere); die Menge des β-Lecithins war 0,1935 g, die des α-Lecithins 0,6692 g, die Proportion 1:3,5.

Mit Polarimeter untersuchte man die optische Aktivität, und es zeigte beim Lecithin, dessen Cadmiumchloridsalz in Aceton löslich ist, durch 20 cm Flüssigkeitsschicht der 1 g in 100 ccm alkoholischer Lösung keine gänzliche optische Aktivität. Bei dem von in Aceton unlöslichem Cadmiumchloridsalz getrennten Lecithin drehte durch 20 ccm Flüssigkeitsschicht der 1 g in 100 ccm alkoholischer Lösung, bei 29° 0,25 Grad nach rechts. Daher $[\alpha]=100/\mathrm{dm}$ $\Rightarrow 100$ mal $0{,}25/2=12{,}5$; also $[\alpha]_D^{31°}=12{,}5$, ist dieses Lecithin das α-Lecithin und das erstere muss zweifellos das β-Lecithin sein.

2) Die Antigenität des α- und β-Lecithins.

Man verglich die Antigenität für das Syphilisserum des α- und des β-Lecithins und nahm als Kontrolle das Rinderherz-Gesamtlecithin und das Standardantigen. Man nahm von jedem Lecithin je 0,5% alkoholische Lösung; die Resultate waren, wie folgt:

Tabelle XI.
Komplementhemmende Wirkung.

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,3	0,2	0,15	0,1	0,075	0,05	0,02	Kontr.
Antigen	1) α-Lecith.	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	2) β-Lecith.	++	++	+	+	++	+++	+++	+++
	3) Rinderherz L.	++	++	−	+	+++	+++	+++	+++
	4) Standard Antigen	−	+	+	++	+++	+++	+++	+++

Antigenität.

		Probierröhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
		Antigenmenge	0,15	0,1	0,075	0,05	0,037	0,02	0,01	Kontr.
0,1 ccm Syphilisserum T.K.	Antigen	1) α-Lecith.	+	+	–	–	–	–	–	–
		2) β-Lecith.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–
		3) Rinderherz L.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–
		4) Standard Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–
0,1 ccm Lepraserum H.M. (W–R +++)	Antigen	1) α-Lecith.	+	–	–	–	–	–	–	–
		2) β-Lecith.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–
		3) Rinderherz L.	+++	+++	+++	++	+	±	–	–
		4) Standard Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–

Wie man aus den Resultaten der Vorversuche in Tabelle XI ersieht, ist die komplementhemmende Wirkung beim β-Lecithin einwenig stärker als die beim α-Lecithin. Die Antigenität des β-Lecithins zeigt einen Grad, der sich mit dem des Rinderherz-Gesamtlecithins und dem des Standardantigens messen kann. Im Gegensatz dazu hatte das α-Lecithin gar keine Antigenität aufzuweisen.

Hierauf wurden die α- und Rinderherz-Gesamtlecithinlösungen und das Standardantigen vierzehnfach, das β-Lecithin zwanzigfach verdünnt, wurde je 0,5 ccm als Gebrauchsmenge verwendet und die Komplementbindungsreaktion auf verschiedene Seren untersucht. Die Resultate sind in Tabelle XII gezeigt; man sieht daraus, dass das β-Lecithin sowohl für das Syphilis- wie auch für das Lepraserum genau dieselben Reaktionsresultate zeigt wie das Standardantigen und das Rinderherz-Gesamtlecithin. Das α-Lecithin war in allen Fällen des Syphilisserums negativ und nur bei einem Fall des Lepraserums, welches die positive Wassermann'sche Reaktion zeigte, war die Reaktion zweifelhaft (±).

Tabelle XII.

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
M.S.	Syph.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	–
		3)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	–
K.O.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ +	+	+	–	–	–
		3)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		4)	+ + +	+ +	+ +	+	–	–	–
Y.M.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
M.M.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ +	+ +	+	–	–	–
		3)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		4)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
N.K.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		3)	+ + +	+ +	+	+	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
F.H.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–	–
A.O.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	–	–
D.N.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+	–	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+	+	–	–	–

M.K.	Syph.	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
H.U.	Syph.	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	+ + +	+ +	+	—	—	—	—
		3)	+ + +	+ +	+	—	—	—	—
		4)	+ + +	+ +	+ +	+	—	—	—
H.M. (W–R —)	"	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	—	—	—	—	—	—	—
		3)	—	—	—	—	—	—	—
		4)	—	—	—	—	—	—	—
M.M.	"	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	+	+	—	—	—	—	—
		3)	+	±	—	—	—	—	—
		4)	+	+	—	—	—	—	—
S.O. (W–R —)	"	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	—	—	—	—	—	—	—
		3)	—	—	—	—	—	—	—
		4)	—	—	—	—	—	—	—
G.N. (W–R —)	"	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	—	—	—	—	—	—	—
		3)	—	—	—	—	—	—	—
		4)	—	—	—	—	—	—	—
T.M. (W–R + + +)	L.T.	1)	±	—	—	—	—	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	—	—	—
H.M.	"	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	—	—
N.O. (W–R —)	"	1)	—	—	—	—	—	—	—
		2)	—	—	—	—	—	—	—
		3)	—	—	—	—	—	—	—
		4)	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XII.—(Fortsetzung).

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	00,5	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
K.F. (W–R –)	L.T.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
I.S.	G.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
T.I.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
M.S.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
U.T.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–

Aus diesen Experimenten wird klar, dass die Hauptsubstanz des Antigens der Wassermann'schen Reaktion im Rinderherz-Lecithin das β-Lecithin ist.

VII. Das aus verschiedenen Organen getrennte α und β-Lecithin.

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, zeigt das β-Lecithin Antigenität gegen das Syphilisserum und ist die Hauptsubstanz der Wassermann'schen Reaktion. Um daher festzustellen, ob in den für das Syphilisserum negativen Rinderhirn-, Rindermilz- und Eigelb-Lecithinen entweder kein β-Lecithin enthalten ist oder wenn vorhanden, dessen Menge zu gering ist, um die Reaktion zu zeigen,

wurden folgende Experimente gemacht.

Nach der vorigen Methode trennte man das α- und β-Lecithin aus dem Rinderhirn-, Rindermilz-, selbstgefertigten reinen Eigelb- und dem Sankyo-Lecithin. Die Proportion der so gewonnenen Menge des Cadmiumchloridsalzes des α-Lecithins beim Eigelb-Lecithin war 4,2 g, das β-Lecithin 0,2 g, daher ist das β-Lecithin 4,55%. Beim Rinderhirn-Lecithin war das Cadmiumchloridsalz des α-Lecithins 1,9 g, 0,1 g des β-Lecithins, was 5% entspricht. Beim Rindermilz-Lecithin war das α-Lecithincadmiumsalz 1,7 g, das β-Lecithincadmium 0,16 g, was 8,6% entspricht. Das β-Lecithin im Rinderherz-Lecithin erreichte nach den schon oft berechneten Zahlen eine Höhe von 23%. Die Proportion beider Formen aus dem aus verschiedenen Organen hergestellten Gesamtlecithinen wird in Tabelle XIII gezeigt:

Tabelle XIII.

Gewebe	Gesamt-Lecithin (g)	Gehalt der α- u. β-Lecithin im Gesamtlecithin		Antigenität des Gesamtlecithins
		α-Lecithin : β-Lecithin	β-L. gehalt (%)	
Rinderherz	0,8627	0,6692 : 0,1935 (g)	22,5	+ + +
Rinderhirn	2,0000	1,9000 : 0,1000	5,0	—
Rindermilz	1,8600	1,7000 : 0,1600	8,6	—
Hühnereigelb	4,4000	4,2000 : 0,2000	4,5	—

Mit 0,5% alkoholischer Lösung wurde die Antigenität dieser β-Lecithine auf das Syphilisserum untersucht. Nach Tabelle XIV hatten bei den Vorversuchen alle β-Lecithine, sowohl die aus den verschiedenen Organen wie die aus dem Eigelb, Antigenität.

Hierauf wurde das Rinderherz-β-Lecithin und das Standardantigen achtfach, alle anderen zwölffach verdünnt und mit je 0,5 ccm die Komplementbindungsreaktion untersucht. Die Resultate sind in Tabelle XV gezeigt; man ersieht, dass die β-Lecithine aus allen Organen für das Syphilisserum dieselbe Reaktion wie das Standardantigen zeigen; doch waren sie alle gegen das Gesundenserum negativ.

Tabelle XIV.

Komplementhemmende Wirkung.

Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Antigenmenge		0,3	0,2	0,15	0,1	0,05	0,02	0,01	Kontr.
Arten der Antigene	β-Lecithin 1) Rinderherz	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	β-Lecithin 2) Rinderhirn	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	β-Lecithin 3) Rindermilz	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	β-Lecithin 4) Eigelb (selbst dargestellt)	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	β-Lecithin 5) Eigelb (Sankyo's Präparat)	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	β-Lecithin 6) Standard-antigen	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Antigenität.

	Probierröhrchen Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
	Antigenmenge		0,15	0,1	0,075	0,05	0,037	0,02	0,01	Kontr.
Y.O. (W–R + + +) 0,1 ccm	Arten der Antigene	β-Lecithin 1) Rinderherz	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–
		β-Lecithin 2) Rinderhirn	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	–
		β-Lecithin 3) Rindermilz	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–
		β-Lecithin 4) Eigelb (selbst dargestellt)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	–
		β-Lecithin 5) Eigelb (Sankyo's Präparat)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
		β-Lecithin 6) Standard-antigen	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–

Tabelle XV.

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
T.H.	Syph.	1)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	—
		3)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
		5)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	—
D.F.	„	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
		5)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
D.M.	„	1)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		2)	+ + +	+ +	+ +	+	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	—	—
		5)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
D.O.	„	1)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	±	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	—	—
		5)	+ + +	+ +	+ +	+	—	—	—
		6)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
H.T.	„	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—	—
		2)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
		3)	+ + +	+ + +	+	+	—	—	—
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—	—
		5)	+ + +	+ + +	+	+	—	—	—
		6)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	—
D.K.	„	1)	+ +	+ +	+	+	—	—	—
		2)	+ +	+	+	—	—	—	—
		3)	+ +	+	±	—	—	—	—
		4)	+ +	+ +	+	—	—	—	—
		5)	+ +	+	+	—	—	—	—
		6)	+ +	+ +	+	±	—	—	—
Z.E.	„	1)	+	+	—	—	—	—	—
		2)	+	+	—	—	—	—	—
		3)	+	±	—	—	—	—	—
		4)	+	+	—	—	—	—	—
		5)	+	±	—	—	—	—	—
		6)	+	+	—	—	—	—	—

Tabelle XIX.—(Fortsetzung)

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
M.K. (W–R –)	Syph.	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
H.Y.	.G	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–
J.T.	„	1)	–	–	–	–	–	–	–
		2)	–	–	–	–	–	–	–
		3)	–	–	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
		5)	–	–	–	–	–	–	–
		6)	–	–	–	–	–	–	–

Diese Experimente zeigen, dass in den Lecithinen des Rinderhirns, der Rindermilz und des Eigelbs, die für das Syphilisserum keine positive Reaktion zeigten, die Substanzen, die Antigenität aufweisen, vorhanden sind, und man weiss, dass diese Substanz die β-Form des Lecithins ist. Wenn man darüber nachdenkt, dass, wie früher schon erwähnt, der Gehalt des die Antigenität enthaltenden β-Lecithins je nach den Geweben Unterschiede zeigt und dass das α-Lecithin keine Antigenität aufweist, wird die Frage, warum die Antigenität je nach dem aus den Geweben gewonnene Gesamtlecithin schwach oder stark, vorhanden ist od. nicht, gelöst. Ferner ist es nicht verwunderlich, dass das als Antigen für die Serumreaktion der Lepra gebrauchte Eigelb-Lecithin auch für das Syphilisserum eine positive Reaktion zeigte [Miyoshi (1930), Sakakibara (1935)], da ihm doch β-Lecithin beigemischt war.

VIII. Sachs und Georgi's Reaktion und β-Lecithin.

Das Antigen der Wassermann'schen Reaktion ist dieselbe Substanz wie das Antigen der Sachs und Georgi'schen Reaktion

(1918), nur ist die Menge des Cholesterins ein wenig anders. Am Syphilisserum, indem das Antigen der Sachs und Georgi'schen Reaction (das ist im Mikrobiologischen Institute dieser Akademie gebraucht) als Kontrolle angewendet wurde, wurde die Reaction durch das β-Lecithin geprüft. Alle Verfahren geschahen nach Sachs'scher Methode.

Da in dem Standardantigen der Sachs und Georgi'schen Reaktion nach meiner Analyse des Standardantigens der Wassermann'schen Reaktion gerechnet, ca. 0,1% Lecithin und ca. 0,05% Cholesterin enthalten ist, habe ich eine 0,1% alkoholische β-Lecithin-Lösung (1) und eine gemischte Lösung (2) von in Alkohol aufgelöstem 0,1% β-Lecithin und 0,05% Cholesterin gemacht, beim Gebrauch die Verdünnung und die anderen Verfahren genau so wie beim Standardantigen (3) ausgeführt und alle drei verglichen.

Tabelle XVI.

Serum	Antigen	Verdünnungsgrad des Serums.						Kontr.
		2	4	8	16	32	64	
D.M. Syphilis (W–R + + +)	1) β-L.	+	+	+	+	+	–	–
	2) β-L. + Chol.	+	+	+	+	+	+	–
	3) Standard-antigen	+	+	+	+	–	–	–

Tabelle XVII.

Serum	Verdünnungsgrad des Antigens	Verdünnungsgrad des Serums.						Kontr.
		2	4	8	16	32	64	
G.H. Syphilis (R–R + + +)	(1) 6	+	+	+	+	+	–	–
	(1) 10	+	+	+	+	–	–	–
	(1) 15	+	+	+	±	–	–	–
	(1) 20	+	+	+	–	–	–	–
	(2) 10	+	+	+	+	+	–	–
	(2) 15	+	+	+	+	–	–	–
	(2) 20	+	+	+	±	–	–	–
	(2) 30	+	+	+	–	–	–	–
	(3) 6	+	+	+	+	–	–	–

Da die Antigene (1) und (2) nach einer sechsfachen Verdünnung einen höheren Reaktionsgrad zeigten (Tabelle XVI) als das

Standardantigen, wurde der Verdünnungsgrad erhöht; wie Tabelle XVII zeigt, hatte das β-Lecithin allein bei zehnfacher und das mit Cholesterin gemischte β-Lecithin bei fünfzehnfacher Verdünnung das gleiche Reaktionsresultat wie das Standardantigen. Man stellte fest, dass bei der Beimischung von Cholesterin, verglichen mit der ohne diese, die Reaktion stärker ist.

Mit der zehnfach verdünnten 0,1% β-Lecithin-Lösung und der fünfzehnfach verdünnten gemischten Lösung (Cholesterin + β-Lecithin) wurden bei 19 Fällen am Syphilisserum Experimente gemacht; wie Tabelle XVIII zeigt, stimmten die Resultate der Sachs und Georgi'schen Reaktion alle mit denen des Standardantigens überein.

Tabelle XVIII.

Nr.	Name	Krankheit	Wassermann Reaktion	Sachs u. Georgi—Reaktion			Kontr.
				Standard Antigen (6 ×)	β-Lecithin (10 ×)	β-Lecithin + Cholest. (15 ×)	
1	M.K.	Syph.	+ + +	+	+	+	–
2	Y.N.	„	+ + +	+	+	+	–
3	W.H.	„	+ + +	+	+	+	–
4	D.K.	„	+ + +	+	+	+	–
5	Z.E.	„	–	–	–	–	–
6	J.T.	„	–	–	–	–	–
7	I.N.	„	–	–	–	–	–
8	D.O.	„	+ +	+	+	+	–
9	D.H.	„	+ +	+	+	+	–
10	N.T.	„	+	+	+	+	+
11	Z.Y.	„	+ + +	+	+	+	–
12	D.F.	„	+ + +	+	+	+	–
13	K.M.	„	+ + +	+	+	+	–
14	K.I.	„	–	–	–	–	–
15	M.H.	„	–	–	–	–	–
16	M.O.	„	+ + +	+	+	+	–
17	M.N.	„	–	–	–	–	–
18	T.K.	„	+ + +	+	+	+	–
19	F.I.	„	–	–	–	–	–

Ausserdem bei 11 Fällen des Serum von Gesunden, die Reaktionsresultate waren alle negativ.

Den obigen Resultaten nach glaube ich, dass die Hauptsubstanz des Antigens der Sachs und Geori'schen Reaktion auch das das β-Lecithin sei.

IX. β-Lecithin und β-Kephalin.

In meiner Mitteilung [Sakakibara (1936, b)] über das Studium der Serumreaktion der Lepra habe ich bekräftigt, dass das β-Kephalin eine spezifische Antigenität für das Lepraserum aufweist, und hier wurde mir nun klar, dass die Hauptsubstanz des Antigens der Wassermann'schen Reaktion bei Syphilis das β-Lecithin ist.

Um hier festzustellen, wie das Mischantigen dieser beiden Substanzen für Lepra- und Syphilisserum sich verhält, wurden vier gemischte Lösungen aus 1% β-Lecithin und 1% β-Kephalinlösung zu Proportionen von 5:1 bis 5:4 gemischt, diese als Antigen (1) bis (4) benannt und die Komplementbindungsreaktion untersucht. Da bei den Vorversuchen bei den Proportionen zwischen β-Lecithin und β-Kephalin von 5:1 (1) und 5:2 (2) mit 0,03 ccm Antigenen sich keine komplementhemmenden Wirkungen zeigten, wurden sie 30 fach, und da bei 5:3 (3) und 5:4 (4) mit 0,015 ccm Antigenen auch keine erschien, wurden diese 60 fach verdünnt und je 0,5 ccm davon gebraucht und die Komplementbindungsreaktion untersucht.

Tabelle XIX.

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
D.N. (W–R +++)	Syph.	1)	+++	+++	++	+	–	–	–
		2)	+++	++	+	–	–	–	–
		3)	+	–	–	–	–	–	–
		4)	±	–	–	–	–	–	–
M.M. (W–R +++)	"	1)	+++	+++	++	+	–	–	–
		2)	+++	++	+	–	–	–	–
		3)	++	+	–	–	–	–	–
		4)	+	–	–	–	–	–	–

Tabelle XIX—(Fortsetzung)

Untersuchte Seren	Krankheit	Antigen Nr.	Serummenge						
			0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	Kontr.
F.H. (W–R + + +)	Syph.	1)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		2)	+ +	+	–	–	–	–	–
		3)	+	±	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
N.K. (W–R + + +)	"	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		2)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		3)	+	+	–	–	–	–	–
		4)	–	–	–	–	–	–	–
K.B. (W–R –)	L.T.	1)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		2)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+	±	–	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
K.C. (W–R + + +)	"	1)	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–	–
		2)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	–	–	–
		3)	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	–	–
		4)	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	–	–
M.N. (W–R –)	"	1)	+ +	+	–	–	–	–	–
		2)	+ +	+	–	–	–	–	–
		3)	+ + +	+ +	–	–	–	–	–
		4)	+ + +	+ +	+	–	–	–	–

Aus den Resultaten ersieht man, dass, je grösser die β-Kephalinmenge, desto deutlicher die Reaktion für das Lepraserum und desto geringer die für das Syphilisserum war, was übereinstimmt mit den Resultaten dr Mischung von Rinderherz-Gesamtlecithin und Rinderhirn-Gesamt-Kephalin. (s. Abschnitt V).

Zusammenfassung.

1. Gewöhnlich sind in dem als Antigen der Wassermann'schen Reaktion gebrauchten mit Cholesterin gemischten Alkoholextrakt des Rinderherzens als Lipoide Lecithin (0,324%), Kephalin (0,108%) und Cholesterin (0,173%), ferner in Aceton und in Wasser lösliche Substanzen enthalten.

2. Unter diesen Bestandteilen hat das Lecithin, besonders das optische inaktive β-Lecithin, Antigenität gegen das Syphilisserum.

3. Die dem Analysenresultate gemäss zu gleichen Lipoidmengen wie das Standardantigen gemischte Alkohollösung aus Eigelb-Lecithin, Rinderhirn-Kephalin und -Cholesterin zeigte kaum eine Antigenität gegen das Syphilisserum; wohl darum, weil die β-Lecithinmenge zu gering war.

4. Von dem aus den verschiedenen Organen des Rindes gewonnenen Gesamtlecithin zeigten die Lecithine des Herzens, der Leber und Niere Antigenität gegen das Syphilisserum und die aus der Milz, und dem Hirn gewonnenen kaum eine solche. Doch die aus diesen Lecithinen getrennten β-Lecithine zeigten alle starke Antigenität.

5. Von den aus den Rinderorganen gewonnenen Lecithinen enthält das aus dem Rinderherzen das meiste β-Lecithin, und es wurde der Reihe nach bei dem der Leber, Niere, Milz, Gehirn immer weniger. Beim Lecithin, bei dem, verglichen mit dem α-Lecithin, die Menge des β-Lecithins geringer ist, war entweder keine Antigenität oder nur eine sehr schwache gegen das Syphilisserum vorhanden.

6. Wenn dem Rinderherz-Lecithin Rinderhirn-Kephalin beigegeben wurde, nahm die Antigenität des Rinderherz-Lecithin gegen das Syphilisserum ab oder verschwand ganz; gab man statt Kephalin Cholesterin bei, wurde die Antigenität verstärkt. Diese Tatsache ist auch gleich bei β-Lecithin und β-Kephalin oder Cholesterin.

7. Mit β-Lecithin habe ich die Sachs und Georgi'sche Reaktion geprüft und erzielte dieselben Resultate wie beim Standardantigen. Die Hauptsubstanz des Antigens der Sachs und Georgi'schen Reaktion ist wohl auch das β-Lecithin.

LITERATUR.

Brandt, Guth u. Müller (1926): Klin. Wschr., Jg., **5**, 68 u. 655.

Browning, Cruicksank and M'Kenzie (1910): J. of Path. and Bakt., **14**, 484.

Citron (1907): Berl. klin. Wschr., Jg., **44**, 1370.

Fleischmann (1908): Berl. klin. Wschr., Jg., **45**, 490.

Friedemann (1910): Z. f. Hygiene u. Infekt. Krh., **67**, 279.
Forssmann (1911): Biochem. Z., **37**, 78.
Heimann u. Steinfeld (1928): Z. f. Immunitätsforschung. u. Exp. Therap. **58**, 181.
Iversen (1920): Biochem. Z., **104**, 15 u. 22.
Landsteiner, Müller u. Pötzl (1907): Wien klin. Wschr., Jg., **20**, 1565.
Landsteiner u. Simms (1923): J. of Exp. Med., **38**, 127.
Levene and Rolf (1919): J. of biol. Chem., **40**, 1.
Matsuura (1927): Saikingaku Zasshi, Heft 375, Anhang 39.
Miyoshi (1930): Japanese J. Derm. a. Uro., **30**, 890.
Nakamuta (1928): Japanese J. Derm. a. Uro., **28**, 1163.
Plaut u. Kassowitz (1929): Z. f. Immun. u. Exp. med., **63**, 482.
Rosenheim (1906): Hoppeseyler; Handbuch der physiol. pathol. chemisch. Analyse, S. 324, 1924.
Sachs u. Rondoni (1908): Berl. klin. Wschr., Jg., **45**, 1968.
Sachs, Klopstock u. Weil (1925): Deut. Med. Wschr., Jg., **51**, 589. 589.
Sachs u. Georgi (1918): Med. Klin. Jg. **14**, 805.
Sakakibara (1935): Lepra, **6**, 533.
„ (1936 b): J. of Biochem., **23**, 377.
„ (1936 a): J. of Biochem., **23**, 437.
Sakamoto (1929): Shakaigaku Zasshi, Heft **514**, 1040.
Schmidt (1911): Z. f. Hygiene, **69**, 513.
Sueyoshi (1931): J. of Biochem., **13**, 145.
Suzuki (1930): Proceed. of Imp. Academy, **7**, 605.
Taniguchi (1920): J. of Path. and Bakt., **23**, 364, u. 368.
Torii (1928): Japanese J. Derm. a. Uro., **28**, 711.
Weil u. Braun (1909): Wien. klin. Wschr., **22**, 372.
Witebsky u. Steinfeld (1928): Z. f. Immunitätsforsch. u. Exp. Therap., **58**, 271.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XVIII. On the Carbohydrate Complex of Serum mucoid.

By

GENEI OZAKI.

(*From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Professor H. Masamune*).

(Received for publication, May 22, 1936)

From what Levene and Lópes-Suárez discussed, the carbohydrate complex of serum mucoid belongs to the category of mucoitinsulfuric acid. Their view had been since credited generally until 1931, when C. Rimington referred to this subject and suggested that it looks similar to the association of mannose and glucosamine which is contained in albumin or globulin. No experimental evidence was, however, given by the latter.

The writer tried to prepare the substance from serum after the first mentioned authors, while no precipitate was obtained at all by treatment of its so-called lead salt solution with glacial acetic acid and repeated failures made him finally conceive the description of Levene and Lópes-Suárez doubtful, and led him to undertake the reinvestigation of this problem.

In the present experiment, serum mucoid was isolated and an attempt was made to draw a conclusion from its analytical figures.

Experimental.

Preparation of the serum mucoid.

It was prepared by combining the method of Zanetti with that of Bywaters:

10 liters of bull serum were poured into 20 liters of water which had been just heated to boiling, acidified to pH 5 with 90 cc. of 30% acetic acid and passed, in a wooden pail, for 20 minutes,

by violent currents of steam spouting out of many holes of a spiral lead tube. (pressure of steam: 8 kg per cm^2). After being stood for one day, the liquor was separated from the deposited coagulable proteins first by means of a linen bag and next by a Büchner's funnel and evaporated on a water bath to about 5 liters, added to with 25 cc. of 20% alcoholic thymol solution and dialysed in an ox bladder for 3 days against the tap water. The solution was then made slightly acid to litmus with 30% acetic acid and condensed again on a boiling bath to about 500 cc. The solution was vigorously stirred up continuously in order to avoid charring which is liable to occur at this stage. The mucoid was deposited out finally by addition of 4–5 volumes of 95% alcohol and separated quickly from the latter by centrifugalization, followed by drying in a vacuum dessicator over P_2O_5 (<3 mm Hg).

Purification: The brownish crude product thus obtained was pulverised in a mortar and extracted with 4 changes of 100 parts of water, each time by boiling the mixture for several minutes with constant shaking. The combined extracts were condensed nearly to a half volume, removed from the suspending particles by means of a centrifuge and condensed again on the water bath. When its volume was decreased to about 100 cc, it was cooled and added to with 4 to 5 parts of 95% alcohol and 1 part of ether. On treatment of the precipitate as before, 5–12 gm of the substance were obtained which was completely soluble in water. For analysis, it was submitted furthermore to 3 days dialysis against distilled water and, after repetition two times of solution and precipitation, dried to a constant weight in vacuo (<3 mm Hg) over P_2O_5.

Nitrogen analysis.

By the micro-Kjeldahl method:

I. 8.3 mg Substance: 0.984 mg N (11.9%).
II. 12.1 mg „ : 1.415 mg N (11.7%).
(By waters: 11.43% by the macro-Kjeldahl method).

The reduction power after preliminary hydrolysis:

By the procedures adopted by Onoe, 2.944 mg of the substance

were found to contain 0.395 mg of reducing substances calculated as glucose, which is the amount corresponding to 13.4% of the mucoid.

According to Bywaters, serum mucoid contains a carbohydrate fraction in approximately 25% computed as glucose.

Tests for glucuronic acid.

Tollens' orcinol reaction: The reaction did not produce any dark green precipitate characteristic of glucuronic acid but cherry red colour, which is extractible with amylalcohol and shows no absorption band in the latter.

Frufurol reaction: 146 mg of the dry substance were weighed in a Kjeldahl flask of 250 cc. capacity, added to with 20 cc. of HCl (sp. gr. 1.19) and the mixture was boiled with spiral reflex condensor (ground joint) for 30 minutes. After it was cooled, 10 cc. of water were run through the condensor into the flask, neutralized to litmus with solid sodium carbonate and subsmitted to steam distillation. To the distillate 5 cc. of 0.01 n $NaHSO_3$ solution and, after 20 minutes, 10 cc. of 0.01 n. iodine solution were pipetted and the excess of iodine was titrated back with 0.01 n thiosulfate. But no more thiosulfate was used than the blank.

Glucuronic acid is, therefore, not present in the seromucoid molecule, in other words, what Levene and López-Suárez believed, was proved to be decidedly incorrect.

Sulfate radicle.

1) Quantitative test.

10 mg of serum mucoid was taken up in a little water and, after addition of 5 cc. of fuming HCl, the solution was heated in a porcelain dish at gentle boiling until it was dried up. The dark remainder was treated with a few cc. of water and the filtrate which had been acidified with a few drops of 2 n. HCl gave a faint turbidity on addition of a little 5% $BaCl_2$ solution.

Serum mucoid thus appears to contain sulfate radicle as Zanetti detected, although Bywaters could not confirm it. But

its amount remains only trace.

2) Quantitative analysis.

312.95 mg of the substance were hydrolysed with 50 cc. of 1 n HCl in a sealed tube for 10 hours at 100°C and the hydrolysate was filtered. Sulfuric acid in the filtrate and the washings were precipitated and weighed as $BaSO_4$. The latter amounted to 3.52 mg (0.46% H_2SO_4). Another example gave 2.41 mg (0.48% H_2SO_4) of the salt from 207.16 mg of substance. These figures are far less than equimolecular to aminosugar. (Confer below).

Aminosugar.

1) Identification.

It was started with 5 gm of air dry substance,* mixed with 50 cc. of fuming hydrochloric acid in a porcelain dish. The mixture was at first boiled mildly on an asbestos sheeting until the volume was reduced to roughly 50 cc, afterwards evaporated on a boiling bath to a thick syrupy consistency and, while still warm, the dark residue was extracted with 100 cc. of water. On faintly alkalinzing with 4 cc. of 10% NaOH solution, an amorphous precipitate fell out from which the solution was removed and shaken with 5 cc. of benzoyl chloride and 32 cc. of 10% alkali for 20 minutes. The benzoylation product which settled out thereupon in a half liquid state was mostly collected on a funnel where it solidified and both the bulk on the funnel and that adhering to the flask wall were taken up in hot 95% alcohol, after being washed with water. Characteristic colourless, thin needless came out on evaporation of the alcoholic solution to a small volume and, from hot alcohol recrystallized, 45 mg was yielded.

It melted at 199°C and no depression in the melting point was caused by mixing it with tetrabenzoyl glucosamine.

2) Quantitative analysis.

Glucosamine was estimated by the Masamune and Naga-

* It contains 10% of moisture.

zumi method (unpublished) taking 107.1 mg of the substance, and 17.13 mg were found to contain 0.908 mg of the aminosugar, corresponding to 5.3%.

Identification and quantitative analysis of non-aminosugar.

With the purpose in view, the methods of the indole and diphenylamine reaction I of Dische and the orcinol method of Tillmans and Philippi were employed, the latter being modified by omitting to dilute the reaction mixture before colour comparison. Although Dische claimed that the colour intensity is strictly proportional to the sugar concentration between the limits from 0.002 to 0.02% in the indole, and from 0.005 to 0.5% in the di-phenylamine reaction I, the results obtained by the writer demonstrated it does not hold. Therefore empirical curves of colorimetric readings not only in Tillmans and Philippi's but also in Dische's method were plotted from the figures given in table I. The colour depth which is developed by 0.01% glucose solution and set at 20 mm was employed as the standard.

The results on serum mucoid are seen in table II. When the

Table I.

Sugar kind	Reading (mm)					
	Sugar concentration (%)					
	0.0075	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
	Orcinol reaction					
Glucose	25.46	20.0	12.6	9.74	7.64	6.36
Mannose	20.52	17.02	9.97	7.08	5.45	4.55
Galactose	20.4	16.7	9.64	6.50	5.2	4.25
	Indole reaction					
Glucose	25.84	20.0	10.48	7.34	5.67	4.86
Mannose	33.7	27.4	14.72	10.25	7.65	6.04
Galactose	32.37	25.28	13.5	9.7	7.26	5.74
Mannose+galactose (3:1)	33.7	26.85	14.62	9.98	7.56	6.02

			Diphenylamine reaction I.			
Glucose	26.94	20.0	11.22	7.32	5.46	4.66
Mannose	24.32	18.76	9.64	6.58	4.90	4.30
Galactose	38.87	30.04	17.0	11.33	9.05	7.70
Mannose+galactose (3 : 1)	27.43	20.83	10.88	7.35	5.56	4.46

Table II.

Conc. of serum mucoid sol. employed for analysis %	Reaction	Percentage of mucoid taken up by non-aminosugar Calc. as			
		Glucose	Mannose	Galactose	3 Mannose+ 1 Galactose
0.25	Orcinol-	15.2	10.4	10.0	
	Indole-	7.2	10.8	10.0	10.6
	Dihenylamine I	11.2	10.2	18.9	11.5
0.15	Orcinol-	14.7	10.6	10.7	
	Indole-	7.3	10.6	9.3	10.8
	Dihenylamine I	13.3	11.0	20.0	12.5
			10.6 (average)		

sugar content is calculated as mannose, the values gained at various concentrations and by different methods coincide well mutually within the experimental error. But, otherwise, they diverge appreciably. So this hexose must be the nonamino-component of the carbohydrate complex and takes up 10.6% of the conjugated protein.

The molecular proportion of mannose to glucosamine is, namely,

$$\frac{10.6}{180} : \frac{5.3}{179} = 2.0$$

Acetyl radicle.

It was estimated according to Postowsky by continuing saponification for 2 hours, distillation for 25 minutes and titrating the distillate by iodometry.

Calculated the volatile acid as acetic acid, 27 mg substances gave 0.346 mg CH_3CO (1.28%).

Its theoretical amount equivalent to glucosamine is

$$5.3 \times \frac{43}{179} = 1.27\%.$$

Most probably, acetyl group is linked to the amino group of the glucosamine by analogy from the construction of chitin and other glucosamine-involving polysaccharides and the prosthetic group of the mucoid in question is composed of mannose and acetylglucosamine in proportion of 2 to 1.

Conclusion.

The carbohydrate fraction of serum mucoid is an association of two molecules of mannose and one molecule of acetylglucosamine or more likely of their multiple.

The writer expresses his thanks to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan which gave a grant toward the expenses of this research.

REFERENCES.

Bywaters, H. W. (1909): Bioch. Z., **15**, 322.
Dische, Z. (1929): Mikrochem., **7**, 33.
Levene, P. A. and López-Suárez, J. (1918): J. Biol. Chem., **36**, 126.
Onoe, T. (1936): J. Biochem., **24**, 1.
Rimington, C. (1931): Biochem. J., **2**, 1062.
Tillmans, J. and Philippi, K. (1929): Bioch. Z., **215**, 40.
Zanetti, C. U. (1897). cited by F. Samuely and F. Stanss, Abderhandens Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden. I. 8. 490.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG ÜBER DIE NAPHTHALIN-LINSENKATARAKT.

Von

MIYOJI MORIYAMA.

(*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Kaiserl. Kyushu-Universität zu Fukuoka, Japan. Direktor: Prof. Dr. K. Kodama.*)

(Eingegangen am 10. Juni 1936)

I. Kapitel.

Untersuchungen über den Harn von Naphthalintieren.

Nachdem Reis (1911) zuerst eine Abnahme des Zysteingehaltes der Linse bei Katarakt als merkwürdige Veränderung mitgeteilt hat, ist diese von zahlreichen Forschern (Jess 1913, Goldschmidt 1917, Seki 1926, Shoji 1927, Cohen, Kamner u. Killian 1928, Tassman 1929) bestätigt und deren Beziehung zur Entstehung der Katarakt eifrigst umstritten worden. Natürlich ist das Zystein in der Linse nicht in freiem Zustande, sondern hauptsächlich in gebundener Form als β-Krystallin vorhanden, so dass die Abnahme der Sulfhydrylgruppe nichts anderes als die Verminderung von β-Krystallin ist, welches schon von Tsuji in diesem Laboratorium (1932) bestätigt wurde. Man nimmt daher bisher im allgemeinen an, dass die Ursache für die Kataraktentstehung bei Naphthalinverabreichung teilweise in einer Verminderung der Sulfhydrylgruppe der Linse zu suchen ist. Diese Annahme bestätigte Nakashima (1934) einwandfrei. Um die Befunde Nakashima's zu komplettieren, habe ich mich mit der Analyse der Schwefelverbindungen des Harns bei Naphthalintieren beschäftigt. Ausserdem wurden auch Versuche mit vielen anderen Naphthalinverbindungen wie α- und β-Naphthol angestellt. Nach Takamura (1912) und Kolinski (1889) erzeugen diese Substanzen schwächere Augenveränderungen als das Naphthalin. Worin dieser Unterschied liegt ist eine sehr interessante Frage. Wie allgemein anerkannt, spielen bei den Entgiftungsprozessen bei solchen Sub-

stanzen im lebenden Organismus die Glukuronsäure und die Schwefelsäure eine grosse Rolle. Das kommt sehr wahrscheinlich daher, dass die Substanzen welche schwächere Augenveränderungen hervorbringen, sich mehr mit Glukuronsäure paaren als mit Schwefelsäure. Ich habe nun Kaninchen Naphthalin oder dessen Derivate peroral verabreicht und einerseits die auftretenden Augenveränderungen, andererseits die mit dem Harn ausgeschiedenen Glukuronsäure- und Ätherschwefelsäuremengen quantitativ bestimmt. Da es sich bei der Entstehungsursache der Katarakt scheinbar doch um Schwefelverbindungen handelt, habe ich auch die Schwankungen an anorganischer Schwefelsäure und neutralem Schwefel im Harn verfolgt.

Untersuchungsmethode.

1. Versuchsanordnung und Material.

Die Kaninchen, die als Versuchstiere dienten, wurden mit Tofukara (dem Rückstand der Bohnenkäsebereitung) und mit Kohl ernährt. Einmal wurde pro kg Körpergewicht 1 g Naphthalin oder dessen Derivate und 1 g Traubenzucker, die mit flüssigem Paraffin gut gemischt in eine Oblate gewickelt wurden, per os gegeben. Der Harn wurde alle 24 Stunden mittels Katheter entleert und untersucht.

2. Bestimmungsmethode.

a) Glukuronsäure wurde in Form von Lakton mit einer etwas modifizierten Methode von Haendel (1924) bestimmt. Zu 10 ccm Harn wurden 10 ccm Bleiessiglösung und 1 ccm 10%ige Ammoniaklösung gegeben. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen, mit 30 ccm Salzsäure in einen Kjeldahl-Kolben eingebracht, dieser mit einem Rückflusskühler versehen und 15 Minuten lang gekocht. Nach dem Abkühlen habe ich mit Natriumkarbonat neutralisiert und dann mit dem Wasserdampfdestillationsapparat solange destilliert, bis 100 ccm Destillat erhalten wurden. Darauf wurden dem Destillat 20 ccm $n/100$ $KHSO_4$ und nach 20 Minuten langem Stehenlassen weiter 30 ccm $n/100$ wässerige Jodlösung hinzugegeben, und schliesslich habe ich mit $n/200$ Natriumthiosulfatlösung

titriert. Zur Kontrolle wurden Leerversuche unternommen.

b) Ätherschwefelsäure und die anorganische Schwefelsäure wurden nach Folin und der Neutralschwefel nach Benedict (1909) und Deed (1910/11) bestimmt.

Resultate.

A. Verabreichung von Naphthalin-Derivaten.

1. β-Naphthylamin.

Tabelle I.
β-Naphthylamin-Versuch.
(Durchschnittswerte von 4 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäur-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	64.90	21.78	161.78	6.10	Vor dem Versuch.
2.	39.48	12.39	73.73	26.27	
3.	24.21	13.34	65.64	7.97	
Durchschnitt:	42.86	15.67	103.92	11.38	
4.	255.96	98.55	180.91	26.98	Arzneigabe
5.	33.74	38.92	72.01	11.94	
6.	72.57	25.97	76.65	18.79	
7.	67.24	24.74	168.28	43.06	
8.	18.94	17.39	138.96	25.70	

Wie man in Tabelle I sieht, zeigt also am ersten Tage nach der Verabreichung des β-Naphthylamins der Glukuronsäure-Laktongehalt des Harns eine durchschnittliche Vermehrung um das 6fache, am zweiten Tage und später finden sich zwar mehr oder weniger grosse Schwankungen, doch bleiben dieselben im Rahmen des Normalen. Die Ätherschwefelsäure zeigt nur am ersten Tage eine Zunahme um das 6fache, an den folgenden Tagen sind keine deutlichen Veränderungen mehr zu beobachten. Die anorganische Schwefelsäure und der Neutralschwefel zeigen keine deutlichen Abweichungen von der Norm.

2. *α-Bromnaphthalin.*

Im Durchschnitt nimmt die Glukuronsäure am ersten Tag um das 8fache, die Ätherschwefelsäure um das 3fache, die anorganische Schwefelsäuremenge mehr oder weniger zu und der Neutralschwefel steigt um das 2½fache; an den darauffolgenden Tagen zeigen sich gegenüber der Norm keine wesentlichen Unterschiede (s. Tabelle II).

Tabelle II.
α-Bromnaphthalin-Versuch.
(Durchschnittswerte von 4 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	65.94	28.06	121.59	20.45	Vor dem Versuch
2.	65.83	11.92	62.21	32.23	
3.	32.74	13.42	67.25	8.32	
Durchschnitt:	54.84	17.46	83.68	17.56	
4.	446.11	50.88	102.71	49.73	Arzneigabe
5.	110.76	37.22	111.55	9.74	
6.	105.88	49.38	121.13	13.89	
7.	73.45	15.91	122.45	34.51	
8.	21.18	15.31	124.00	15.52	

3. *α-Naphthol.*

Im Durchschnitt steigt die Glukuronsäure auf das 5fache des normalen Gehaltes, dann fällt sie allmählich und zwar bis unter den Normalwert. Die Ätherschwefelsäure steigt am 1. Tage nach der Verabreichung des Mittels auf das 8fache des normalen Gehaltes, danach kehrt sie zur Norm zurück. Der Wert für die anorganische Schwefelsäure fällt am ersten Tage auf 1/3 des normalen Wertes und kehrt in den folgenden Tagen zur Norm zurück, der Neutralschwefel wird am 1. Tage auf 1/4 vermindert, am 3. Tage normal und am 4. Tage wieder etwas vermehrt.

Tabelle III.
α-Naphthol-Versuch.
(Durchnittswerte von 2 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	58.86	21.93	130.60	18.20	Vsr dem Versuch
2.	127.14	10.89	67.19	9.05	
3.	85.50	10.50	61.70	12.08	
Durchschnitt:	90.50	14.44	86.49	13.11	
4.	470.58	117.88	28.48	3.44	Arzneigabe
5.	126.97	20.99	84.55	1.41	
6.	114.97	21.73	110.19	13.82	
7.	33.66	9.33	105.86	52.24	
8.	17.81	15.03	133.15	5.22	

4. *β-Naphthol.*

Die Ergebnisse waren dieselben wie beim α-Naphthol.

Tabelle IV.
β-Naphthol-Versuch.
(Durchschnittswerte von 3 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	207.19	38.18	284.11	40.02	Vor dem Versuch
2.	368.50	9.68	94.58	34.29	
3.	420.51	18.15	137.11	25.96	
Durchschnitt:	332.06	22.0	171.19	33.42	
4.	625.66	133.78	5.26	22.78	Arzneigabe
5.	151.70	61.58	192,23	72.18	
6.	494.72	29.75	115.78	25.82	
7.	487.78	30.93	441.77	32.63	
8.	317.38	17.89	75.09	43.37	

5. *Jodbenzol.*

Durchschnittlich nimmt am 1. Tage der Gehalt an Glukuronsäure etwas zu, danach ist an 2 Tagen keine Veränderung zu beobachten, und am 4. Tage findet wieder eine kleine Zunahme statt. Die Ätherschwefelsäure nimmt an den beiden ersten Tagen zu, die anorganische Schwefelsäure dagegen nimmt am ersten Tage ab und zeigt danach keine Veränderung mehr; der Neutralschwefel nimmt am ersten Tage etwas zu, am zweiten weiterhin zu und danach scheint Neigung zur Abnahme zu bestehen.

Tabelle V.
Jodbenzol-Versuch.
(Durchschnittswerte von 3 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Ätherschwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	264.62	22.98	258.27	45.63	Vor dem Versuch
2.	359.70	8.88	145.60	38.96	
3.	339.49	23.11	99.88	45.47	
Durchschnitt:	321.27	18.32	167.92	43.35	
4.	415.74	94.22	25.36	59.50	Arzneigabe
5.	275.89	61.09	137.62	80.07	
6.	314.30	26.23	68.91	16.69	
7.	540.06	40.15	294.23	40.47	
8.	388.62	25.18	62.11	29.74	

B. Verabreichung von Naphthalin.

1. *Naphthalin.*

Die Glukuronsäure nimmt am 1. Tage ab; es kommen zwar auch Fälle vor, in denen eine Zunahme statthat, doch ist der Vermehrungsgrad nur ein sehr geringer. In allen Fällen ist an den folgenden Tage eine Veränderung nicht festzustellen. Die Ätherschwefelsäure nimmt am 1. und 2. Tage zu und kehrt danach zur Norm zurück. Die anorganische Schwefelsäure nimmt während der ersten 3 Tage ab und steigt dann wieder zum Normalwert

zurück. Der Gehalt an Neutralschwefel nimmt am 1. und 2. Tage zu, am 3. Tage auffallend ab und wird am 5. Tage wieder normal.

Tabelle VI.
Naphthalin-Versuch.
(Durchschnittswerte von 3 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	322.51	25.88	353.76	52.81	Vor dem Versuch
2.	595.10	22.94	122.71	38.42	
3.	633.56	27.24	128.79	42.46	
Durchschnitt:	517.06	25.35	201.75	44.56	
4.	393.08	88.81	42.17	81.53	Arzneigabe
5.	509.98	95.58	28.74	83.54	
6.	335.59	27.11	48.98	2.26	
7.	554.53	33.76	388.09	8.94	
8.	359.36	20.03	84.84	34.49	

2. *Naphthalinverabfolgung kombiniert mit Insulininjektion.*

Der Zweck dieses Versuches ist, die Behauptung von Michail & Vancea (1926), dass die Insulininjektion auf die Entstehung der Katarakt hemmend wirkt, bei der Naphthalinkatarakt nachzuprüfen. Den Tieren wurde 5 Tage lang täglich 2 g Naphthalin verabreicht und dazu morgens und abends je eine Einheit Insulin subkutan injiziert.

Der Gehalt des Harns an Glukuronsäure-Lakton nahm in diesem Falle mit der Zeit allmählich zu und betrug am 4. Tage 1 g. Der Gehalt an Ätherschwefelsäure nimmt ebenfalls zu, doch ist der Vermehrungsgrad kein so ausgesprochener wie beim vorigen Versuch. Der Gehalt an anorganischer Schwefelsäure wird allmählich vermindert und erreicht am 5. Tage den Nullpunkt. Der Gehalt an Neutralschwefel nimmt etwas zu, doch sind die Mengen schwankend und werden erst am 5. Tage deutlich vermehrt.

Hier trat in einem Fall nach 5 Tagen und in dem andern Fall nach 3 Tagen Katarakt auf.

Tabelle VII.
Naphthalin-Versuch mit Insulin kombiniert.
(Durchschnittswerte von 2 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	47.58	35.87	24.84	57.34	Vor dem Versuch
2.	24.58	28.28	28.48	23.83	
3.	41.43	34.27	13.14	48.90	
4.	53.82	29.12	96.75	96.47	
Durchschnitt:	41.85	31.89	40.80	75.51	
5.	151.86	60.44	22.91	105.96	Arzneigabe
6.	558.84	84.43	17.70	76.96	„
7.	506.14	41.31	11.06	98.03	„
8.	1108.81	52,78	3.34	114.81	„
9.	1086.84	42.59	0.00	221.49	„

3. *Naphthalinverabfolgung kombiniert mit Adrenalininjektion.*

5 Tage lang wurden täglich 2 g Naphthalin per os und dazu morgens und abends je 1 ccm 0.1%iges Adrenalin subkutan verabfolgt.

Die Glukuronsäure nimmt schwankend zu, auch die Ätherschwefelsäure ist leichtgradig gesteigert. Die anorganische Schwefelsäure zeigt nur Neigung zur Abnahme und der Neutralschwefel zeigt deutliche Zunahme. Augenveränderungen waren ebenso wie bei den Versuchen mit Naphthalinderivaten nicht festzustellen.

Tabelle VIII.
Naphthalin-Versuch mit Adrenalin kombiniert.
(Durchschnittswerte von 2 Kaninchen)

Beobachtungstage	Glukuronsäure-Lakton in mg	Äther-Schwefels. in mg	Anorg. Schwefels. in mg	Neutr. Schwefel in mg	Bemerkg.
1.	39.81	51.29	37.54	80.86	Vor dem Versuch
2.	44.51	20.36	41.22	51.62	
3.	246.39	21.37	29.15	43.66	
4.	221.22	42.69	108.84	58.28	
Durchschnitt:	137.98	35.24	54.19	56.88	
5.	370.15	64.67	31.15	183.47	Arzneigabe
6.	680.75	65.27	41.59	251.41	„
7.	620.24	31.81	17.28	118.36	„
8.	410.87	50.66	35.14	77.79	„
9.	504.88	73.16	32.38	101.96	„

Schluss.

Glukuronsäure-Lakton: Die Glukuronsäure-Lakton-Ausscheidung bei ein und demselben Kaninchen bleibt sich gleich, zeigt aber individuelle Unterschiede. Am 1. Tage nach der Verabreichung von Naphthalinderivaten ist im allgemeinen eine Erhöhung festzustellen, deren Maximum das 8fache des normalen Wertes beträgt. Im Gegensatz dazu besteht bei Naphthalingabe eine Abnahme. Vom 2. Tage an ist bei allen Versuchen im allgemeinen keine bedeutende Veränderung festzustellen.

Ätherschwefelsäure: Am 1. Tage nach der Verabreichung der Naphthalinderivate wird eine 2-8fache Vermehrung in der Ausscheidung der Ätherschwefelsäure beobachtet; beim Naphthalinversuch beläuft sich die Ausscheidungsmenge auf das 3½fache der normalen Menge.

Anorganische Schwefelsäure: Bei Verabreichung der Naphthalinderivate werden je nach den Versuchsbedingungen am 1. Tage Zu-oder Abnahme beobachtet, bei Fütterung mit Naphthalin tritt immer Abnahme ein.

Neutralschwefel: Naphthalinderivate rufen Zu- oder Ab-

nahme hervor; Naphthalin verursacht immer eine deutliche Zunahme, die bedeutend höher ist, als die durch Derivate bedingte.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schliessen, dass kurz nach der Naphthalinverabreichung die Verbindung mit der Glukuronsäure schwerer vor sich geht als in einem späteren Stadium. Die Derivate dagegen verbinden sich leicht und schnell mit der Glukuronsäure. Die Ausscheidung des Naphthalins aus dem Organismus geht also viel langsamer vor sich, als die der Derivate. Die Ausscheidung des Naphthalins und die seiner Derivate geht als Ätherschwefelsäure in beiden Fällen fast gleichmässig vor sich. Die Abnahme in der Ausscheidung von anorganischer Schwefelsäure weist darauf hin, dass das Naphthalin ebenso wie seine Derivate meist an die Ätherschwefelsäure oder an den Neutralschwefel gebunden ausgeschieden wird. Da die Derivate in verhältnismässig hohem Grade als Ätherschwefelsäure ausgeschieden werden, so scheint es, als ob der anorganische Schwefel sich leicht zu Ätherschwefelsäure umwandelt, während er nach Naphthalingabe hauptsächlich als Neutralschwefel ausgeschieden wird.

Die Tatsache, dass im Naphthalinharn der Neutralschwefelgehalt ein sehr hoher ist, stimmt mit der von anderer Seite beobachteten Verminderung des Glutathions und Cysteins sowie dem Eiweisszerfall überein. Nach den Versuchen von Nakashima zu urteilen, wird aus irgendwelchem Grunde das Naphthalin an das Cystein gebunden ausgeschieden, und es ist wahrscheinlich, dass die abnorm hohe Ausscheidung an Neutralschwefel in Zusammenhang mit dieser Erscheinung steht.

Es ist nach allem anzunehmen, dass durch das Naphthalin, das einerseits ein Abnahme des Zysteingehaltes und das β-Kristallins der Linse und andererseits eine Veränderung der Eigenschaften in der Linse veranlasst, eine Veränderung in der Permeabilität der Linsenkapsel eintritt, durch welche die Katarakt dann entsteht.

Wie klinisch anerkannt, kommt die menschliche Katarakt häufig beim Diabetiker vor. Daher ist die günstige Wirkung von Insulin für Katarakt wohl denkbar. Michail & Vancea (1926) haben auf Grund ihrer Versuche behauptet, dass durch Insulin-Injektion die Katarakt geheilt, oder doch in seiner Entwicklung

gehemmt werden kann, und dass die Ursache für die Kataraktentstehung in einer Funktionsstörung der Pankreas zu suchen sei. Danach hat Nakashima (1933) in unserem Laboratorium den Kaninchen nach Entfernung der Pankreas Naphthalin verabreicht, dabei jedoch bezüglich der Kataraktentwicklung im Vergleich zum normalen Kaninchen keinerlei Unterschied feststellen können. Bei meinen Versuchen zeigte sich, dass nach der Injektion von Insulin neben der Naphthalinverabreichung der Gehalt des Harns an Glukuronsäure und Neutralschwefel bedeutend zunahm und dabei Katarakt entstand. Demnach scheint mir nur eine Pankreasdysfunktion als Ätiologie der Naphthalinkatarakt nicht annehmbar.

Auch bei Kombination der subkutanen Adrenalininjektion mit der Naphthalinverfütterung konnte weder Katarakt, noch sonst ein bemerkenswerter Befund erhoben werden.

II. Kapitel.

Untersuchung über den Ascorbinsäuregehalt des Naphthalinkaninchens.

Neben der schon lange bekannten antiskorbutischen Wirkung besitzt die Ascorbinsäure die Fähigkeit, ein biologisch sehr wichtiges Redoxsystem zu bilden. Das erklärt auch ihre so ausserordentlich wichtige Rolle, die sie für den Stoffwechsel der Augenlinse höchstwahrscheinlich spielt. Die Existenz von Ascorbinsäure in der Augenlinse wurde zuerst von Harris (1933) bewiesen und dann von vielen Forschern bestätigt. Seit Müller (1933) fand, dass sich die Ascorbinsäure im Kammerwasser bei Rinderkatarakten und bei den mit Naphthalin vergifteten Kaninchen stark vermindert, hat man der Kataraktentstehung im Zusammenhang mit dem Ascorbinsäuregehalt der Augenlinse grosse Aufmerksamkeit zugewandt. Euler & Martius (1933) fanden, dass beim Menschen die Ascorbinsäure in der kataraktösen Linse stark vermindert ist.

Dann haben Nordmann & Wien (1934) und Fischer (1934) diese Angabe bestätigt. Müller, Buschke, Gurewitsch & Brühl (1934) haben bei Rinderkatarakt das quantitative Ver-

schwinden derselben Säure festgestellt. Nach Müller & Buschke (1934) vermindert sich die Ascorbinsäure in der Augenlinse bei Naphthalinkatarakt und nach Uchimi (1935) auch bei Massagekatarakt. In dieser Annahme untersuchten viele Forscher dieses Gebiet, um die Ursache der Katarakte zu finden. Fischer (1934) gibt an, dass die Vitamin-C-Bildungsstörung der Linse die Ätiologie der Linsentrübung sein mag. Szent-Gyoeryg(1934) denkt, dass das Vitamin C für die Erhaltung der Linsenklarheit notwendig ist. Nach Müller (1934) und Monjukowa (1935) haben die an C-Vitamin reichen Nahrungsmittel keine Schutzwirkung gegen die Linsentrübung, während nach Bourne & Adam (1933) dies wohl der Fall ist. Nach früheren Angaben von Müller usw. (1934) tritt keine Heilungstendenz nach intravenöser Injektion des Vitamin C auf, aber später berichtigten Müller & Buschke(1934) ihre Ansicht dahin, dass die Ascorbinsäure eine Heilwirkung zu haben scheint. Vor kurzer Zeit lag ein Bericht über das Auftreten der Linsentrübung bei Skorbut des Meerschweinchens (Monjukowa & Fradkins 1935) vor. Ich untersuchte nicht nur den Vitamin-C-Gehalt der Linse bei Naphthalinkatarakt, sondern auch den der verschiedenen Körperteile des Kaninchens, um die ätiologische Bedeutung des Vitamin C bei Naphthalinkatarakt zu finden.

Untersuchungsmethode.

Versuchsanordnung und Material.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen, die im Stoffwechselkorb gehalten wurden. Jeden Tage wurde das Tier mit 400 g Tofukara (dem Rückstand der Bohnenkäsebereitung) und 150 g Kohl gefüttert. Täglich einmal wurden 1 g Naphthalin und 1 g Traubenzucker pro kg Körpergewicht verabreicht. Die Arzenei wurde mit flüssigem Paraffin gut gemischt, in eine Oblate getan und per os eingegeben. Nach mehreren Tagen trat milchigweisse Trübung in der Linse auf.

Bestimmungsmethode.

Das Versuchstier wurde durch Durchschneiden der Carotis entblutet und sofort nach dem Töten seziert. Nach dem Wiegen

wurde das Gewebsstück mit Seesand und 10 ccm 3%iger Metaphosphorsäurelösung im Glasmörser zerrieben und abzentrifugiert. Aus dem Rückstand wurde das Vitamin C nochmals extrahiert. Die Zentrifugate (ca. je 10 ccm) wurden zusammengegossen und mit der Metaphosphorsäurelösung auf das konstante Volumen von 25 ccm aufgefüllt. Zur Bestimmung der Askorbinsäure in dieser Flüssigkeit habe ich die Dichlorphenolindophenolmethode angewandt.

Versuchsergebnisse.

Tabelle I.
C-Vitamingehalt der gesunden und kataraktösen Kaninchen.

Gewebe	Normale Kaninchen		Kataraktöse Kaninchen		
	C-Vitamingehalt in mg %	Zahl der Versuchstiere	C-Vitamingehalt in mg %	Verhältnis gegenüber der Norm in %	Zahl der Fälle
Hirn	18.8	7	18.1	96.3	8
Linse	14.6	15	1.3	10.3	8
Kammerwasser	24.4	2	2.7	11.0	6
Lunge	12.7	6	10.7	84.2	7
Herz	2.0	6	1.3	65.0	8
Leber	7.9	6	9.7	122.8	7
Magen	2.0	7	3.7	185.0	8
Milz	26.3	7	27.0	102.6	8
Pankreas	7.5	7	7.2	96.0	8
Niere	6.9	7	3.8	55.0	8
Nebenniere	135.8	6	135.8	100.0	8
Hoden	36.9	4	37.5	101.6	4
Ovarium	35.1	3	36.5	103.8	4
Muskel	1.0	7	0.8	80.0	8

Wie die Tabellen I und II zeigen, wird der Gehalt der verschiedenen Organe an Askorbinsäure bei den täglich mit Naphthalin gefütterten Kaninchen nicht deutlich verändert. Der Askorbinsäuregehalt bei normalen Kaninchen beträgt 18.8 mg% im Gehirn, 2.0 mg% im Magen, 36.9 mg% im Hoden und 35.1 mg% im

Ovarium; bei den kataraktösen Kaninchen 18.1 mg% im Gehirn, 3.7 mg% im Magen, 37.5 mg% im Hoden und 36.5 mg% in den Ovarien. Auch der Askorbinsäuregehalt in diesen Organen bei nicht kataraktösen Kaninchen nach Naphthalinverabreichung entspricht fast ganz dem bei kataraktösen Kaninchen. Bei den gesunden Tieren beträgt die Askorbinsäure in der Milz 26.3 mg% und in der Nebenniere 135.8 mg%. Auch bei den kataraktösen Kaninchen ist die Menge der Askorbinsäure in diesen Organen fast normal. Obgleich noch eine Woche nach der Naphthalinverabreichung die Askorbinsäurewerte in diesen Organen keine auffallende Verminderung zeigen, werden im Verlaufe der Zeit dieselben bis unter die Norm herabgesetzt.

Tabelle II.
C-Vitamingehalt des Naphthalinkaninchens ohne Katarakt.

Kan.-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Durchschnittswerte (mg%)	Verhältnis gegenüber der Norm (%)	Kontrolle (mg%)
Behandlungstage	1	2	3	4	5	6	8	18	22			
Körpergewicht (g)												
Beginn	1870	1450	—	1500	1700	1960	2030	—	—			
Ende	1820	1450	1770	1340	1480	1600	1560	1650	2340			
Hirn	21.9	23.0	23.7	20.4	19.8	18.7	17.5	18.9	21.1	20.5	109.0	18.8
Linse	21.4	16.8	13.5	19.2	20.3	20.4	15.3	9.5	9.4	16.2	111.0	14.6
Kammerwasser	4.1	10.3	10.0	6.4	0.5	8.4	5.1	—	7.6	7.8	31.9	24.4
Lunge	16.9	16.4	6.6	5.5	—	5.7	3.0	2.3	5.9	7.8	61.4	12.7
Herz	1.6	1.4	1.6	1.5	3.3	1.8	1.8	1.4	1.1	1.7	85.0	2.0
Leber	3.4	14.7	—	2.1	4.9	7.1	1.3	2.3	3.4	7.8	61.4	7.9
Magen	1.5	7.1	4.1	2.4	8.2	2.7	2.2	3.4	4.5	4.0	200.0	
Milz	35.2	39.5	21.9	35.8	38.4	14.7	9.4	11.7	0.5	22.9	87.0	26.3
Pankreas	9.0	2.2	3.1	4.9	6.1	5.0	3.0	4.5	4.0	4.6	61.0	7.5
Niere	4.1	6.4	4.1	4.7	8.1	3.4	3.5	2.5	1.1	4.2	61.0	6.9
Nebenniere	136.1	180.4	60.9	180.4	140.0	95.7	50.5	62.5	56.2	106.9	78.0	135.8
Hoden	42.2	32.4	27.8	66.8	—	27.6	—	—	—	39.3	106.5	36.9
Ovarium	—	—	—	—	37.5	—	—	28.3	23.3	29.1	80.9	35.1
Muskel	0.8	0.5	1.1	1.3	1.1	0.7	0.4	0.9	0.7	0.8	80.0	1.0

Die Askorbinsäure bei normalen Kaninchen beträgt 6.9 mg% in der Niere und 12.7 mg% in der Lunge. Bei kataraktösen Kaninchen und auch bei den mit Naphthalin gefütterten Tieren mit noch klarer Linse vermindert sich die Askorbinsäure in den oben genannten Organen. Bei den normalen Kaninchen beträgt die Askorbinsäure 7.9 mg% in der Leber, 2.0 mg% im Herzen und 1.0 mg% im Muskel. Nach Naphthalinvergiftung scheinen die Askorbinsäurewerte in den meisten Organen ein wenig abzunehmen.

Wie die Tabelle III zeigt, schwankt bei meinem Versuche an Kaninchen der Vitamin-C-Gehalt der normalen Linse von 7.9 bis 17.9 mg% (Durchschnittswert 14.6 mg%). Die Augenlinse des rechten und des linken Auges enthalten fast die gleiche Menge C-Vitamin. Der Vitamin-C-Gehalt bei normalen Rinderlinsen beträgt 22.7 bis 28.2 mg% in 16 Fällen (durchschnittlich 25.2 mg%).

Tabelle III.
C-Vitamingehalt der normalen Kaninchenlinse.

Kan.-Nr.	Körpergewicht (g)	C-Vitamingehalt (mg%)	
		Links	Rechts
1	1170	15.0	17.2
2	1330	15.1	16.9
3	1280	16.6	17.5
4	1330	17.3	—
5	1230	15.7	16.5
6	1560	16.5	16.4
7	1440	17.9	—
8	1240	17.3	16.6
9	1550	7.9	8.3
10	2130	14.8	14.2
11	1230	10.2	10.5
12	1550	10.3	10.3
13	1770	16.5	17.8
14	2360	15.4	15.9
15	1410	13.0	11.5
Durchschnitt		14.6	14.6

Wie Tabelle IV zeigt, habe ich bei 9 Kaninchen mit experimenteller Naphthalinkatarakt den Vitamin-C-Gehalt der Linse untersucht und habe dabei interessanterweise festgestellt, dass der C-Vitamingehalt in der kataraktösen Linse 0.0 bis 5.2 mg%, im Durchschnitt 1.3 mg% oder 1/10 des normalen Wertes beträgt.

Tabelle IV.
C-Vitamingehalt der kataraktösen Linse.

Kan.-Nr.	Körpergewicht		C-Vstamingehalt	
	Beginn	Ende	Links	Rechts
1	1500	1190	1.8	2.0
2	2500	1860	0.5	0.6
3	1590	1330	2.2	2.3
4	1850	1710	2.6	2.6
5	1550	1060	0.0	0.0
6	1420	1380	0.0	0.0
7	1650	1350	0.0	0.0
8	1830	1630	4.5	5.2
9	1900	1750	0.0	0.0
Durchschnitt:			1.3	1.4

Der C-Vitamingehalt im Kammerwasser des kataraktösen Auges beträgt 11% des normalen Wertes (s. Tabelle I).

Tabelle V.
C-Vitamingehalt der Naphthalinlinse ohne Trübung.

Kan.-Nr.	Körpergewicht (g)		Behandlungsdauer (Tage)	Geschl.	C-Vitamingehalt (mg%)	
	Beginn	Ende			Links	Rechts
1	1870	1820	1	♂	21.1	21.8
2	1450	1450	2	♂	17.7	15.0
3	—	1700	3	♂	13.5	—
4	1500	1340	4	♂	19.2	—
5	1700	1480	5	♀	20.4	20.2
6	1960	1600	6	♂	20.7	20.2
7	2030	1510	8	♀	15.4	15.3
8	—	1650	18	♀	9.3	9.7
9	2340	1690	22	♀	10.0	8.7
Durchschnitt:					16.4	15.7

Solange die Naphthalinkaninchenlinse noch nicht getrübt ist, nimmt niemals der C-Vitamingehalt in der Linse ab, dagegen kann man beobachten, dass derselbe im Kammerwasser stark herabgesetzt ist (s. Tabelle I und V).

Schlussbemerkungen.

Unabhängig vom Auftreten der Linsentrübung bei allen Naphthalinkaninchen konnte ich keine deutliche Verminderung des Askorbinsäure-gehaltes in den verschiedenen Geweben finden. Dagegen ist die starke Herabsetzung des Vitamin-C-Gehaltes in der Linse und im Kammerwasser von kataraktösen Kaninchen in meinen Versuchen festgestellt; diesen Befund haben bereits viele Autoren mitgeteilt. Im Hinblick auf die physiologische Wirkung der Askorbinsäure scheint es wahr zu sein, dass ihr Verschwinden aus der Augenlinse die Ätiologie der Katarakt ist. Neuerdings berichtete Nakashima (1934), dass sich die reduzierte Form der Glutation sogar in der nicht kataraktösen und klaren Linse des Naphthalinkaninchens bis auf die Hälfte vermindert. Wenn die Vitamin-C-Abnahme der Augenlinse die Ursache der Katarakt wäre, dann müssten wir die Askorbinsäureabnahme nur infolge von Naphthalinverfütterung finden, obgleich noch keine Linsentrübung auftritt. Jedoch meine Untersuchungen haben das sichere Ergebnis geliefert, dass nach Naphthalinverfütterung keine Vitamin-C-Abnahme einsetzt, solange keine Linsentrübung besteht. Dieses Resultat stimmt auch mit denen von Müller & Buschke (1934) und Euler & Malmberg (1934) überein. Deshalb scheint mir die C-Vitamin-Verminderung eine Folgeerscheinung der Linsentrübung zu sein, und ich glaube deshalb nicht, dass die Linsentrübung nur infolge von Vitamin-C-Abnahme entsteht.

III. Kapitel.

Über die Permeabilität der kataraktösen Linse.

Viele Forscher halten die Veränderung der Permeabilität der Linsenkapsel für ein wichtiges ätiologisches Moment der Linsenkatarakt. Wie Tsuji (1932) sicher nachgewiesen hat, ist das

β-Krystallin bei Linsentrübung stark vermindert. Diese Tatsache allein macht es sehr wahrscheinlich, dass eine starke Permeabilitätsstörung der Kapsel vorhanden ist. Aber darüber gibt es noch keine systematische Forschung und die Meinungen vieler Forscher gehen darüber noch auseinander. Einige behaupten die Steigerung, andere die Herabsetzung der Durchlässigkeit bei der Katarakt. Bei meinem Versuch zur Klärung dieser Frage kam ich zu den folgenden Ergebnissen.

Versuch.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen. Die Naphthalinkatarakt wurde nach der Adamschen und die Massagekatarakt nach der Hesschen Methode hervorgerufen. Das Kaninchen wurde durch intravenöse Luftinjektion getötet. Die frisch entnommene Linse wurde mit destilliertem Wasser vorsichtig gewaschen, mit Filtrierpapier abgetupft, gewogen und dann in ein Reagenzglas gelegt. Nach 3 Stunden langem Stehenlassen im Thermostat bei 25°C wurde die Linse entnommen. Als Versuchslösungen wurden 1.02% NaCl, 1.78% $CaCl_2$, 6.4%ige Glukose, 1.3% KCl und 0.6%ige Salzsäure gebraucht. Die Konzentration der Lösungen wurde so ausgewählt, dass sie mit der Körperflüssigkeit isotonisch wurde. Das Gewicht der von der 1 Gramm schweren Linse aufgenommenen Substanz in mg zeigt die Linsenpermeabilität an. Mit 3 ccm Wasser wurde sehr vorsichtig die entnommene Augenlinse und auch das Reagenzglas, in dem die Linse gelegen hatte, gewaschen; dieses Waschwasser wurde mir der Versuchsflüssigkeit vereinigt und die ganze Lösung analysiert. In den folgenden Tabellen sind die Mengen der untersuchten Substanzen aufgenommen, die pro Gramm Linse umgerechnet sind.

Resultate.

Glukose: In die 1 g schwere, normale Linse drang 26.77 mg Traubenzucker ein. Die Menge, welche die Naphthalinkataraktlinse durchlässt, beträgt 12.78 mg; sie sinkt also auf 47.6% des normalen Wertes. Die Permeabilität der Massagekataraktlinse beträgt 17.45, vermindert sich also auf 64.7% des Normalwertes.

Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist die Durchlässigkeit der Glukose bei der Naphthalin- sowie der Massagekatarakt stark herabgesetzt. Aber solange die Linse noch nicht getrübt ist, können wir keine deutliche Verschiebung und keine regelmässige tägliche Veränderung der Linsenpermeabilität an den mit Naphthalin gefütterten Kaninchen beobachten.

Tabelle I.
Permeabilität der Glukose in die Linse.

Versuchs-Nr.	Normale Linse (mg pro g Linse)	Naphthalin-kataraktlinse (mg pro g Linse)	Massage-kataraktlinse (mg pro g Linse)	Naphthalinlinse ohne Trübung	
				(mg pro g Linse)	Naphthalin-gabe in Tagen.
1	23.27	12.13	16.351	26.63	3
2	22.76	13.03	17.499	24.37	3
3	26.37	14.65	19.157	22.58	3
4	27.87	12.66	12.236	22.33	3
5	26.37	13.27	20.441	25.09	3
6	26.13	13.15	15.309	25.14	3
7	29.57	15.55	18.554	21.61	7
8	28.38	10.33	17.656	20.98	7
9	28.32	11.00	19.344	24.82	9
10	28.84	—	—	27.47	11
11	25.41	—	—	25.33	11
12	28.61	—	—	—	—
Durchschnitt:	26.77	12.78	17.45	24.21	—

$CaCl_2$ (als Calcium berechnet): Die normale Permeabilität beträgt 1.756, bei Naphthalinkatarakt ist dieselbe 1.18 (67.1% der normalen) und bei Massagekatarakt 1.117 (63.6% der gesunden). Ich konnte keine Veränderung in der Naphthalinlinse ohne Trübung finden (s. Tabelle II).

NaCl (als Natrium berechnet): Bei dem Chlornatriumversuche beträgt die Durchlässigkeit der normalen Linse 2.545, während die der Naphthalinkataraktlinse 0.814 (31.94% der normalen Permeabilität) und die der Massagekataraktlinse 0.722

Tabelle II.
Permeabilität des Calciums.

Versuchs-Nr.	Normale Linse (mg pro g Linse)	Naphthalin-kataraktlinse (mg pro g Linse	Massage-kataraktlinse (mg pro g Linse)	Naphthalinlinse ohne Trübung	
				(mg pro g Linse)	Naphthalingabe in. Tg.
1	1.807	1.543	1.116	1.679	1
2	1.847	1.519	0.994	1.668	2
3	1.746	1.301	1.170	1.859	2
4	1.810	1.190	0.988	1.821	6
5	1.806	1.223	1.421	1.914	6
6	1.640	0.671	1.102	1.764	7
7	1.685	0.614	1.009	1.641	7
8	1.676	1.354	1.189	1.801	7
9	1.635	1.354	1.182	1.797	7
10	1.675	—	—	—	—
11	1.665	—	—	—	—
12	1.769	—	—	—	—
13	2.116	—	—	—	—
Durchschnitt:	1.756	1.18	1.117	1.772	—

Tabelle III.
Permeabilität des Natriums.

Versuchs-Nr.	Normale Linse (mg pro g Linse)	Naphthalin-kataraktlinse (mg pro g Linse	Massage-kataraktlinse (mg pro g Linse)	Naphthalinlinse ohne Trübung	
				(mg pro g Linse	Naphthalingabe in Tg.
1	2.686	0.5943	0.626	2.441	1
2	2.575	0.4856	0.494	2.334	1
3	1.976	1.1390	0.707	2.591	6
4	2.034	1.1520	0.821	2.497	6
5	2.676	1.3040	1.369	2.299	7
6	2.666	1.4280	0.575	2.128	7
7	2.033	0.4890	0.560	2.260	9
8	2.734	0.9750	—	2.096	12
9	2.790	0.3364	—	2.096	12
10	2.503	0.3057	—	2.126	22
11	2.856	—	—	2.092	22
12	2.477	—	—	—	—
13	2.930	—	—	—	—
14	2.822	—	—	—	—
Durchschnitt:	2.545	0.8140	0.722	2.078	—

(28.3% der gesunden) ausmacht. Bei der klaren Naphthalinlinse können wir keine deutliche Veränderung der Linsenpermeabilität finden (s. Tabelle III).

KCL (als Chlor berechnet): Die Permeabilität der getrübten Augenlinse bei der Massagekatarakt beträgt 0.964, das bedeutet eine Senkung auf 58% der normalen Linse (s. Tabelle IV).

Tabelle IV.
Permeabilität des Chlorkaliums.

Kan.-Nr.	Gesunde Linse (mg Cl)	Massagekataraktlinse (mg Chlor)
1	1.457	0.747
2	2.079	1.006
3	1.887	1.142
4	1.305	1.051
5	1.653	0.873
Durchschnitt	1.667	0.964

Salzsäure (als H-Ion berechnet): Der normale Wert zeigt 0.114, aber der der Massagekataraktlinse 0.123. Nur bei dem Salzsäureversuch konnte ich im Gegensatz zu den übrigen beschriebenen Substanzen die Permeabilitätszunahme der getrübten Linse finden.

Tabelle V.
Permeabilität der Salzsäure.

Versuchs-Nr,	Gesunde Linse (mg H)	Massagekataraktlinse (mg H)
1	0.1118	0.1068
2	0.1130	0.1213
3	0.1360	0.1235
4	0.1118	0.1328
5	0.1015	0.1171
6	0.1321	0.1440
7	0.1024	0.1138
Durchschnitt	0.114	0.123

Schluss.

Nach meinen experimentellen Resultaten drangen das Calcium- und das Natriumchlorid weniger in die getrübte Linse bei Naphthalin- und Massagekatarakt als in die normale Linse ein. Daher konnte ich bei meinen Permeabilitätsversuchen nicht, wie viele Autoren, (für Calcium Burge (1909), Adams (1929), Updegraff(1932), Mackay(1932), Grabar(1933), Salit(1933) und Evans & Kern (1931); für Natrium Burge (1909), Burdon-Cooper (1928), Evans & Kern (1931) und Mackay (1931) eine Zunahme dieser Salze in der kataraktösen Linse nachweisen. Bezüglich des Kaliumgehaltes der getrübten Linse stimmt die Verminderung der Kaliummenge, die in die Massagekataraktlinse eindringt, mit den Ergebnissen der quantitativen Kaliumbestimmung von Ashikaga (1925), Burdon-Cooper (1928), Adams (1929), Evans & Kern (1931) und Makay (1932) überein. Die Durchlässigkeit der Glukose in die Augenlinse hat Friedenwald (1930) studiert und die Altersabnahme derselben gefunden. Nach meinen Versuchen vermindert sich die Durchlässigkeit der Glukose bei Naphthalin- und Massagekatarakten.

Von der Verminderung der Linsenpermeabilität kann ich auf verminderte Einführung der wichtigen Stoffe und ungenügenden Ersatz der geschwundenen Substanz schliessen. Dadurch ist es leicht denkbar, dass sich die wichtigen Linsenbestandteile bei Katarakten vermindern. Deutschmann (1897) hat schon früh, die später von Labbé & Lavagna(1925) und von Cahane(1932) bestätigte Tatsache gefunden, dass bei Katarakten sich die festen Bestandteile der Augenlinse vermindern.

In der kataraktösen Linse sind das wasserlösliche Eiweiss nach Moerner (1894), das Gesamtkristallin nach Hektoen & Schulhof (1923), das β-Krystallin nach Jess (1913) und Tsuji (1932) und das Salz nach Burge (1909), Evans & Kern (1931) und Mackay (1932) herabgesetzt. Ich habe bei meinem Versuch festgestellt, dass die Salze im allgemeinen weniger in die getrübte Linse als in die klare dringen; weil das Krystallin ein globulinartiges Eiweiss ist, hat es eine besondere Fähigkeit, sich mit anorgani-

schen Salzen zu verbinden und zugleich das Wasser zu erhalten. Daher ist das Wesen der Salzgehaltverminderung und der Permeabilitätsabnahme im Schwinden des wasserlöslichen Linseneiweisses zu suchen.

PH der normalen Linse ist nach Labbé & Lavagna (1926) 7.5–7.6. nach Scalinci (1927) 7.38, nach Buglia (1927) 7.64 an der Rinde und 7.14 im Kern, nach O'Brien & Salit (1931) 7.4 und zuletzt nach Salit (1933) 7.45. Beim Altersstar ist PH der getrübten Linsen nach Labbé & Lavagna (1926) 6.6 und nach Sauermann (1934) 6.2. Nach meinem Versuche kann man die Permeabilitätätszunahme der Salzsäure in die getrübte Linse finden. Vielleicht besteht diese Zunahme infolge von Vermehrung des α-Krystallingehaltes in der getrübten Linse. Von verschiedenen Gesichtspunkten aus kann man vermuten, dass das Sauerwerden der Reaktion in der Augenlinse die Entstehung der Linsentrübung erleichtert. Neuerdings nach Tsuji (1932) ist der isoelektrische Punkt des α-Kristallins mehr alkalisch als bei der normalen Linse und hält sich infolge des Einflusses von K, Na und β-Krystallin mehr nach der sauren Seite. Wenn sich Kalium und β-Krystallin in der Linse stark vermindern, so genügt nur das leichte Sauerwerden des Mediums, um das α-Krystallin zu fällen. Dadurch kann man leicht verstehen, dass die Zunahme der Wasserstoffionen in der Linse von grosser Bedeutung ist.

Nach meinen experimentellen Ergebnissen ist klargestellt, dass die kataraktöse Linse eine verkleinerte Bindungsfähigkeit mit Salzen, dagegen eine vergrösserte mit Säure hat. Bei der Katarakt ist das Linseneiweiss in einem sehr leicht fällbaren Zustande. Wahrscheinlich haben solche Veränderungen der Augenlinse eine innige Beziehung zur α-Krystallinzunahme und β-Krystallinabnahme. Der physikalisch-chemische Zustand der kataraktösen Linse, in welchem das α-Krystallin sehr leicht ausfallen kann, wird durch meine experimentellen Ergebnisse durchaus gestützt.

Zusammenfassung.

1. Ich habe Kaninchen Naphthalinverbindungen (Naphthalin, β-Naphthylamin, α-Bromnaphthalin, Naphthole und Jodbenzol)

verabreicht und die Schwefelverbindungen und die Glukuronsäure des Harns untersucht.

Ergebnisse:

Nach Verabfolgung der einzelnen Naphthalinverbindung vermehrt sich die Ätherschwefelsäure um das mehrfache des normalen Gehaltes, doch gibt es keine deutlichen Unterschiede beim Naphthalin- und Naphthalinderivat-Versuche.

Beim Naphthalin-, Jodbenzol- und Naphtholversuch vermindert sich die anorganische Schwefelsäure, während beim β-Naphthylamin und α-Bromnaphthalinversuch keine auffallende Abnahme gefunden wurde.

Nach Naphthalinverabreichung ist die Zunahme des Neutralschwefels am grössten. Beim Naphthalinderivatversuch wurde keine so deutliche Zunahme desselben gefunden.

Obgleich beim Naphthalinderivatversuche die Glukuronsäure des Harns deutlich zunimmt, konnte ich beim Naphthalinversuch keine deutliche Zunahme finden.

Bei Kombination der Insulin- oder Adrenalininjektion mit Naphthalinverfütterung konnte ich keinen bemerkenswerten Befund erheben.

2. Dem Kaninchen wurde Naphthalin verabreicht und die Veränderung an Askorbinsäuregehalt in verschiedenen Organen verfolgt. Es wurde dabei gefunden, dass viele Organe keine bemerkbare Veränderung gezeigt haben. Auch die Linse selbst zeigte keine Abnahme, solange keine Trübung auftrat. Nur wenn Katarakt bestand, wurde starke Verminderung beobachtet.

3. Die Bindungsfähigkeit der kataraktösen Linse für NaCl, KCl, $CaCl_2$ und Glukose ist stärker herabgesetzt als die der normalen Linse, dagegen für HCl mehr gesteigert. Die Erklärung für diese Erscheinung ist gegeben.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Kodama für Anregung und freundliche Leitung, sowie auch für die Durchsicht des Manuskriptes meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Adams (1929): Biochem. Journ., **23**, 902.
Benedict (1909): Journ. of biol. Chem., **6**, 363.
Bourne & Adams (1933): Br. J. of Ophth., **17**, 220.
Burdon-Cooper (1928): Trans. Ophth., Soc. U. Kingdom., **48**, 340.
Burge (1909): Arch. of Ophth., **38**, 435.
Deed (1910/11): J. of biol. Chem., **8**, 401.
Euler & Malmberg (1934): Z. f. physiol. Chem., **230**, 225.
Euler & Martius (1934): Z. f. physiol. Chem., **222**, 65.
Evans & Kern (1931): Am. J. Ophth., **14**, 1029.
Fischer (1934): Klin. Wschr., **13**, 596.
„ „ Ref. Zentralbl. f. d. ges. Ophth. u. ihre Grenz., **32**, 517.
„ „ „ Arch. f. Aug., **108**, 118 und 527.
Folin (1905/6): J. of biol. Chem., **1**, 131.
Friedenwald (1930): Arch. of Ophth., **3**, 182.
Gurewitsch (1934): Arch. f. Aug., **108**, 592.
Händel (1924): Z. f. d. ges. exp. Med., **42**, 172.
Harris (1933): Nature, **132**, 27.
Jess (1913): Z. f. Biol., **61**, 93.
Mackay, Robertson & Stewart (1932): Brit. J. Ophth., **122**, 488.
Michail & Vancea (1926): Ref. Ber. u. d. ges. Physiol. u. exp. Pharm., **36**, 87.
„ „ (1927): Ebenda, **40**, 455.
Monjukowa & Fradkin (1935): Arch. f. Ophth., **133**, 328.
Mörner (1894): Z. f. physiol. Chem., **18**, 61.
Müller (1933): Natur, **132**, 280.
Müller & Buschke (1934): Arch. f. Aug., **108**, 368, 592, 597.
„ „ „ Kl. Monatsbl. f. Aug., **93**, 110.
Müller, Buschke, Gurewitsch & Brühl (1934): Klin. Wschr., **13**, 20.
Nakashima (1934): Jour. of Biochem., **19**, 281.
Nordmann et van Wien (1934): Ref. Zentralbl. f. d. ges. Ophth. u. ihre Grenz., **32**, 140.
O'Brien and Salit (1933): Am. Journ. Ophth., **16**, 863.
Salit (1933): Am. J. Ophth., **9**, 571.
Szent-Györgyi (1934): Ber. ü. d. ges. Phy. u. exp. Pharm., **80**, 254.
Takamura (1912): Arch. f. Aug., **70**, 335.
Tsuji (1932): Journ. Biochem., **15**, 33.
Uchimi (1935): Nippon Seikagakukai Zasshi, **10**, 54.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

STUDIES ON A DIAMINOACID, CANAVANIN.

V. The Synthesis of Canalin.

By

MATSUNOSUKE KITAGAWA.

(*Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyushu Imperial University, Fukuoka.*)

(Received for publication, June 13, 1936)

In the previous paper (1936), I investigated the properties of canalin in comparison with those of *o*-hydroxylamino acetic acid, $NH_2 \cdot O \cdot CH_2 \cdot COOH$, and recognized the coincidence of the properties considered due to the presence of *o*-hydroxylamino group, $NH_2 \cdot O$, at both substances. I therefore came to the same conclusion as formerly assumed (1933) that canalin should have the formula $NH_2 \cdot O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$.

The present report is made of an experiment for the purpose of proving this conclusion. I tried to synthesize α-amino γ-*o*-hydroxylamino butyric acid from α-benzoylamino γ-iodo butyric acid ethyl ester by the method, which I have used in preparing *o*-hydroxylamino acetic acid as reported in the previous study (1936) and α-o-hydroxylamino propionic acid in this study. I proved the synthesized compound to be identical with canalin produced from canavanin by the liver ferment, canavanase. Canalin, therefore, was ascertained to be α-amino γ-*o*-hydroxylamino butyric acid, $NH_2 \cdot O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$, as was formerly assumed, and accordingly canavanin, which has been synthesized from α-benzoyl canalin by the guanidation in the previous study (1936), was also confirmed to have the formula $NH_2 \cdot C(NH) \cdot NH \cdot O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$.

The process of the synthesis is shown by the following equations:

(1) $$HO \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH + C_6H_5COCl = HO \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NHCOC_6H_5) \cdot COOH + HCl$$

(2) $$\mathrm{HO{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NH{\cdot}COC_6H_5){\cdot}COOH}$$
$$=\underbrace{\mathrm{CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5)CO}}_{\mathrm{O}}+\mathrm{H_2O}$$

(3) $$\underbrace{\mathrm{CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5)CO}}_{\mathrm{O}}+\mathrm{HI}+\mathrm{C_2H_5OH}$$
$$=\mathrm{I{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5+H_2O}$$

(4) $$\mathrm{I{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2CH(NHCOC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5+C_6H_5CO{\cdot}NH{\cdot}OK}$$
$$=\mathrm{C_6H_5CONH{\cdot}O{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5+KI}$$

(5) $$\mathrm{C_6H_5CONH{\cdot}O{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NH{\cdot}COC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5+3H_2O}$$
$$=\mathrm{NH_2{\cdot}O{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NH_2)\ COOH+2C_6H_5COOH+C_2H_5OH}$$

Experimental.

I. Synthesis of α-benzoylamino γ-iodo butyric acid ethyl ester, $I{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5$.

Canalin was proved to be easily converted into α-amino γ-oxy butyric acid on hydrogenation by means of platinum black, as was formerly reported (1933), and the latter was laevo rotatory in the aqueous solution.

$$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{14}=\frac{-1.24\times 100}{7.565\times 2}=-8.20^\circ$$

On the other hand, Gulland and Morris (1935) obtained inactive α-amino γ-brom butyric acid, directly from canavanin heated with conc. hydrobromic acid at 160° in a sealed tube, and ascertained indirectly the formation of α-amino γ-oxy butyric acid from canalin. From these results, α-amino γ-oxy butyric acid was considered to be the determined substance in the decomposition products of canavanin. I, therefore, used this acid as the starting material for the synthesis of canalin, the split product of canavanin by the ferment.

For this purpose, α-amino γ-oxy butyric acid was benzoylated with benzoyl chloride and caustic soda in the half normal alkaline solution, and the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid, then the benzoyl product with benzoic acid was precipitated, and benzoic acid was removed by extraction with ether. The resultant benzoyl product was acid against to congored, melted at

140–144°, and was known to be α-benzoylamino γ-oxy butyric acid from the previous studies (1933).

This product was dissolved in 1% hydrochloric acid solution, and on warming it at 70° for thirty minutes, it was easily converted into α-benzoyl amino γ-butyrolactone, $CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5)CO$, which was crystallised out in needles on condensing the solution. It melted at 139°, was slightly soluble in water, more soluble in alcohol, neutral to litmus, and was laevo rotatory in the alcoholic solution.

$$[\alpha]_D^{17} = \frac{-0.75 \times 100}{1.340 \times 2} = -27.99°$$

The α-benzoylamino γ-butyrolactone thus obtained was suspended in a small quantity of absolute ethyl alcohol, and gaseous hydrogen iodide dried by calcium iodide was saturated into the solution under cooling, so lactone was easily iodized. The reaction mixture was evaporated into syrup *in vacuo,* and on adding water to it, the iodized product was crystallised out in needles, which product was recrystallised from the alcoholic solution by dilution with water.

It was soluble in alcohol, not in cold water, slightly soluble in hot water, neutral to litmus, melted at 119–120°, and its combined iodine was easily precipitated with silver nitrate.

Substance was dried at 80° *in vacuo.*

subst.	34.41 mg	AgI 22.50 mg	I=35.35%	
subst.	6.224 mg	N_2 0.220 cc. (759.8 mm 21.8°)		N=4.03%
calc. for		$C_{13}H_{16}O_3NI$	I=35.15%	N=3.88%

From these results, it was considered to be α-benzoylamino γ-iodo butyric acid ethyl ester, $I{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5$.

II. Synthesis of α-amino γ-o-hydroxylamino butyric acid, $NH_2{\cdot}O{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NH_2){\cdot}COOH$.

In the previous studies (1936), it was shown that *o*-hydroxylamino fatty acid could be prepared by the condensation of benz-

hydroxamic acid with brom fatty acid in the presence of alcoholic potash.

Now this method was applied to prepare α-amino γ-o-hydroxylamino butyric acid. Benzhydroxamic acid (1.5 mol), which was prepared from hydroxylamine and benzoylchloride, was dissolved in alcohol with alcoholic potash (1.5 mol), and after adding conc. alcoholic solution of α-benzoylamino γ-iodo butyric ester, the mixture was shaken for six hours at 40°. After that the reaction mixture was cooled, potassium benzhydroxamate separated was filtered, the filtrate was evaporated into dryness *in vacuo,* and the residue was extracted with absolute alcohol. The alcoholic extract was again evaporated into syrup *in vacuo,* and on adding water to it, the condensation product was separated as a viscous mass. This product was again dissolved in alcohol, precipitated with water, and this treatment was repeated until no more benzhydroxamic acid was detected by ferric chloride test in the filtrate. This substance did not become solid, neutral to litmus, soluble in alcohol, and scarcely so in water. It was considered to be α-benzoylamino γ-benzoyl hydroxylamino butyric acid ethyl ester, $C_6H_5CO{\cdot}NH{\cdot}O{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH(NHCOC_6H_5){\cdot}COOC_2H_5$.

This product was hydrolysed in boiling 10% hydrochloric acid solution for three hours, and, after cooling the solution, separated benzoic acid was filtered. The filtrate was evaporated into dryness *in vacuo,* the residue was dissolved in water, and the calculated amount of picric acid was added to the solution, so the picrate of the product was crystallised out in needles, which picrate was recrystallised from hot water. The picrate thus obtained melted at 193–194° under decomposition, and it was identified with canalin picrate (m.p. 193–194°).

Free substance was obtained from the picrate by the usual method. It melted at 214° under decomposition (canalin m.p. 214°), its aqueous solution was neutral to litmus, gave ninhydrin reaction and Jaffe's reaction characteristic to canalin, did not reduce Fehling's solution, its aqueous solution was laevo rotatory, and indicated the general characters of canalin.

Substance was dried at 100° *in vacuo.*

$$[\alpha]_D^{19} = \frac{-0.19 \times 100}{1.176 \times 2} = -8.08^\circ \quad ([\alpha]_D^{13} \text{ of canalin} = -8.31^\circ)$$

subst. 3.972 mg N_2 0.718 cc. (760.9 mm 23.0°) N=20.45%
calc. for $C_4H_{10}O_3N_2$ (canalin) N=20.89%

From the above properties, this synthesized α-amino γ-*o*-hydroxylamino butyric acid was identified with canalin obtained from canavanin.

If the temperature during the condensation became higher than 40°, sometimes synthesized canalin was contaminated with a trace of some substance, which reduced Fehling's solution. In such a case the synthesized canalin was purified as follows. Canalin thus obtained was first converted into copper salt by copper carbonate, and added with a excess of acetaldehyde, so the characteristic insoluble copper salt of ethyliden canalin was produced as was described on the previous paper (1935). This copper salt recrystallised from hot water was then decomposed with hydrogen sulphide, and hydrolysed in boiling 3% sulphuric acid solution for several hours, and thus pure canalin was obtained from it by the usual method.

III. Synthesis of α-o-hydroxylamino propionic acid, $NH_2 \cdot O \cdot CH(CH_3) \cdot COOH$.

To benzhydroxamic acid (1 mol) dissolved in alcohol with alcoholic potash (2 mol) was added alcoholic solution of α-brom propionic acid ethyl ester (1 mol), and the mixture was allowed to stand for one day at room temperature. After that separated potasium bromide was filtered off, the filtrate was evaporated into dryness *in vacuo,* the residue was extracted with 80% alcohol, and the alcoholic extract was slightly acidified with sulphuric acid. Precipitated potasium sulphate was filtered off, the filtrate was again evaporated into syrup *in vacuo,* and on adding ether to it, it was crystallised. The crystalline product thus obtained was very hygroscopic, acid against to congored, and did not give Jaffe's reaction. It was considered to be benzoyl hydroxylamino propionic acid, $C_6H_5CO \cdot NH \cdot O \cdot CH(CH_3)COOH$.

This benzoyl product was heated with 5% hydrochloric acid solution at 100° for fifty minutes, and after cooling, the separated benzoic acid was filtered off, the filtrate was evaporated into dryness *in vacuo*. The residue was extracted with absolute alcohol, the alcoholic extract was condensed into syrup, and on adding ether to it, it was crystallised out in needles. This crystalline product was easily soluble in water and alcohol, not in ether, melted at 168° under decomposition, acid to congored, did not reduce Fehling's solution, and gave distinct Jaffe's reaction as in the cases of canalin and *o*-hydroxylamino acetic acid.

substance 25.107 mg AgCl 25.094 mg Cl=24.62%
calc. for $C_3H_8O_3NCl$ Cl=25.05%

From these properties, this substance was proved to be identical with *α-o*-hydroxylamino propionic acid hydorchloride, $HCl{\cdot}NH_2{\cdot}O{\cdot}CH(CH_3){\cdot}COOH$, which was formerly obtained from benzenyl amidoxime and *α*-brom propionic acid by Werner and Sonnenfeld (1894) and melted at 168°.

LITERATURES.

Gulland, J. M. and Morris, C. J. O. R. (1935): Jour. Chem. Soc., 1935, 763.
Kitagawa, M. and Monobe S. (1933): Jour. Biochem., **18**, 333.
Kitagawa, M., Sawada, K. and Hosoki, Y. (1935): Jour. Agri. Chem. Soc. Japan, **11**, 1.
Kitagawa, M. and Takani, A. (1936): Jour. Biochem., **23**, 181.
Werner, A. and Sonnenfeld, E. (1894): Ber., **27**, 3350.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

DEPENDENCE OF THE BIOLOGICAL EFFECT OF SEXUAL HORMONES ON THEIR CHEMICAL STRUCTURE.

By

IGOR REMESOV.

(*From the Department of Colloidal Chemistry of the Chemico-Pharmacological Research Institute, Moscow.*)

(Received for publication, June 25, 1936)

Investigations published of late by Butenandt and his school give evidence of a highly specific action of the corpus luteum sterone (luteosterone), whereas the specific action of the follicular hormone is found to be very slight (Dodds-Cook, Cook-Hewett-Lawson).

Thus we observe in one and the same group of female sterones, two substances essentially different as to their reciprocal connections in the chemical structure and the physiological effect, whereby the cause of this phenomenon is yet unexplained.

In the present communication we make the attempt to systematize the known data on the female and male sexual hormones and to follow up the dependence of the physiological effect upon the chemical structure of the sterone.

Luteosterone group.

The hormone of the yellow body (luteosterone) represents an unsaturated diketon corresponding, as regards its formula, to Δ^4-pregnendion. Without exageration it can be said that full display of the specific biological action of this hormone can be obtained when the complete chemical groupment corresponding to the formula Δ^4-pregnendion is present.

All the numerous derivatives and isomers of luteosterone are perfectly inactive.

The experimental data obtained by Butenandt, his school a.o.

showing the high specific action of luteosterone, admit the following argumentation: the situation and presence of a double bond, in general, is to be considered as the most important factor in the specificity of Δ^4-pregnendion: a characteristic feature is its situation between C_4 and C_5, which excludes the cis trans isomerism of rings A and B of the sterone structure and equally its β, α-situation relatively to the CO-group situated at C_3.

The above mentioned can be demonstrated as follows: the shifting of the double bond leads simultaneously to trans-isomerism of rings A/B and to loss of activity. The isomer Δ^1-allo-pregnendion (3.20) is inactive. So is the $\Delta^{5.6}$-pregnen-dion (3.20) distinguished by the β, γ-situation of the double bond with regard to the CO-group at C_3.

Saturation of the double bond leads to the stereoisomerism of rings A and B, whereby the obtained *pregnandion* and *allo-pregnan-dion* are physiologically inert, the effect of the hormone being lost.

The part performed by the CO-group at C_3 is also a very essential one, as all the other groupments of the sterone structure being kept intact, the substitution of the keto-group by a secondary alcohol one results in the loss of the physiological effect. Thus, for inst., the oxyketon [Δ^5-*pregnen-ol* (*3*)-*on* (*20*)] is inactive.

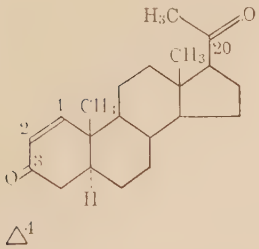
The part of the CO-group at C_{20} is similar to the above described. Its constitution by an OH-group leads to the loss of the physiological effect of sterone Δ^4-pregnen-ol (20)-on (3), which was isolated by Butenandt, up to 1 mg doses proved to be inactive.

All these correlations are shown in structural formulae of the above combinations in fig. 1.

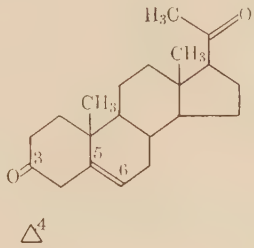
Thus it is not some single chemical group in its molecule which is to be considered as responsible for the physiological action of the hormone, but the whole chemical structure typical for a Δ^4-*pregnendion* (*3.20*). The question, which part of this structure should be considered as the most specific, the most typical, most characteristic and different from the other derivatives of luteosterone, can now be easily answered by means of a detailed chemical analysis of the combination. The whole, so to say originality of structure of luteo-

Scheme 1.

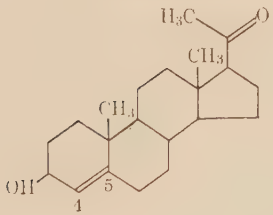
Δ^1-allo-pregnen dion (3.20)



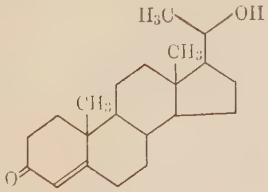
Δ^6-pregnen-dion (3.20)



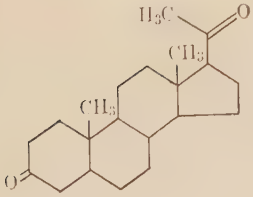
Δ^1-pregnen-ol (3)-on (20)



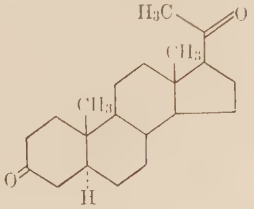
$\%^1$pregnen-ol (20)-on (3)



Pregnan-di-on (3.20)



Allo-pregnan-di-on (3.20)



sterone, consists in the fact *that the situation of the double bond in the ring structure at C_4—C_5 excludes the isomerism of rings A and B, while the least shifting of the double bond from this situation, or its saturation immediately leads to the cis-trans isomerism of rings A and B.* Evidently the cause for the high specific action of the yellow body hormone is to be sought just in the isomerism of rings A and B.

Folliculosterone-group.

The particular physiological action of the follicular hormone, known as oestrum in animals, is due to substances which have a structure very near to the unsaturated ring structure. Cyclopenteno-phenanthrene, neoergosterol and its derivatives, sterol products of irradiation by u. v. rays, vitaminogenic gums, calciferol and, finally, cancerogenic gums of phenanthrene and anthracene rows—all these are substances which in large doses show the same effect in animals. They have all one and the same in common namely: unsaturated state or aromatization of the ring structure of the reduced phenanthrene withdrawn from the ringsthrene. As soon as we pass to the *saturated* types of just the same compounds the effect inherent to folliculosterone will be lost. The same result shows perhydrated, saturated follicular hormone. Considering the above described facts it is evident that the prevailing significance for the appearance of the specific biological effect is to be ascribed to the unsaturated state of the sterone molecule. *Elimination of the OH- and CO-groups* from the sterone molecule leads to complete loss of the biological effect. But then substitution of these groups should be a great power in the hands of the chemist as it admits the regulation of the action of the compound.

Substitution of the secondary alcohol group at C_3 with formation of esters is not the way to loss of activity with folliculosterone—as supposed by Doisy-Ralls-Jordan—but means an essential modification in this action which is rather of *quantative* and, by no means, of *qualitative* character. The effect of esters consists in a *continuous, protracted action* on the organism. The introduction of a single dose of the hormone ester results in the formation of a sort of depository of the hormone, which, however, is active and that for a prolonged time (10 to 16 days running). Such an action of the follicular sterone esters is easily explained by *slow* saponification of the ester in the organism.

Of equal importance is the discovery of Schwenck and Hildebrandt that *substitution and reduction of the keto-group at* C_3 *instead of destroying, on the contrary, sharply increases the*

physiological effect of folliculosterone. The obtained dihydrofolliculosterone excells pure hormone in power by many times.

In summarizing all the above described, it may be admitted that, generally the action of the follicular hormone is *relatively non specific.* The dependence of its biological effect on the structure is very limited: the molecule of the sterone can largely be modified without injury to its phyisological properties. The loss of the biological effect is entirely due to saturation of its molecule, while the creation within it of more active groupments leads to the appearance of even more active derivatives.

Androsterone group.

The testicular hormone represents a saturated oxyketon which as to its structure corresponds to 3.oxy-epi-etio-allo-cholanone (17).

The physiological action of androsterone is more specific than that of follicular hormone, whereby the specificity depends on its stereoisomerism closely approaching isomerism of the derivatives of luteosterone. It must be considered as exceedingly characteristic, that all the same, as in the case with follicular hormone esterification of the OH-group and reduction of the keto-group also brings about the effect of increased physiological activity of the preparation. The greater part of derivatives of androsterone are physiologically active compounds, the degree of activity only varying, being evidently dependent on the isomerism of these substances.

For better elucidation of the various existing correlations, on Table II are represented the structural formulae of all the compounds of the testicular hormone group, published up to this last time; the compounds are arranged according to the degree of their biological effect.

The analysis of the data of "schema 2" leads to the conclusion, that the specific physiological effect of these compounds has for basis the stereo-isomerism of rings A and B complicated by epimerism. From this view-point it is quite clear why *testosterone,* Δ^4-androsten-ol (17)-on (3), shows maximal the effect, as compared with the rest of compounds of the same group: here, as well as in Δ^4-pregnendion the situation of the double bond between C_4

and C_5 excludes the cis-trans isomerism of rings A and B, whereas the saturation of the latter leads to a series of stereo-isomeric androstans.

The importance of the OH-group at C_{17} as a more active one, as compared to the keto-group, follows from the fact, that Δ^4-*androsten-dion* (*3.17*) proves to be yet less active, equalling by its power androsterone. Perfectly remarkable is, the complete analogy with the relations in the yellow body hormone: the shifting of the double bond from the α, β-situation to the β, γ-situation leads to inactivation of the sterone. We have stated the inactiveness of $\Delta^{5.6}$-pregnen-dion, just the same can be said of $\Delta^{5.6}$-*androsten-diol.*

Another factor which determines the activity of the compounds of the androsterone group is the epimerism which connect these compounds with the epi-derivatives of the saturated row of cholesterol. Actual materials permit to state the following lawfulness: *the reciprocal spatial disposition of the OH-group at C_3 and the H-atom at the meeting point of A and B is of essential importance for the physiological activity of the isomers of androsterone. The highest activity possess the following spatial combinations of these groups:*

The trans-situation of the OH-group at cis-isomerism of rings A and B.

The cis-situation of the OH-group at trans-isomerism of rings A and B.

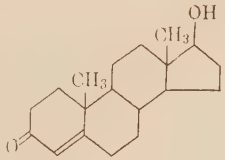
As examples might be mentioned androstan-diol and androsterone.

On the contrary if the spatial cis-trans isomeric configuration of the OH-groups and rings A/B in the molecule coincide with the compound, the disposition of the other substituents being quite analogous, becomes almost inactive. As example we cite: iso-androstan-diol and iso-androsterone.

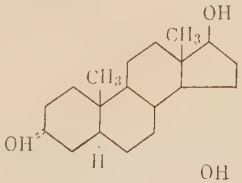
The equivalence as to the power of biological action of the row of compounds differing from one another by their substituents can thus be explained by the indicated factors.

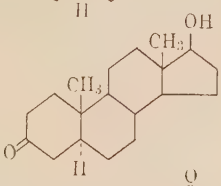
Scheme 2.

1 HE = 25–30 γ : Δ^4Androsten-ol(17)-on(3) :
(Testosterone)

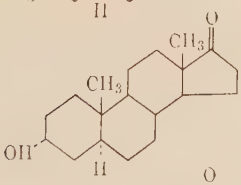


1 HE = 50 γ : (Androstan-diol :
(Androstan-ol(17)-on(3) :

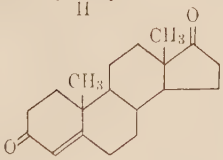




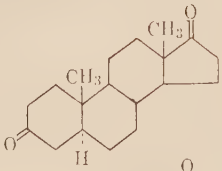
1 HE = 150–200 γ : (Androsterone :



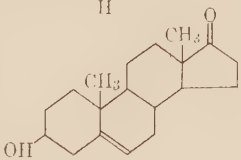
Androsten-dion :



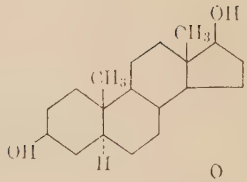
1 HE = 300–400 γ : Androstan-dion :



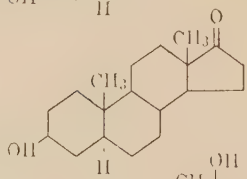
1 HE = 400–600 γ : Δ^5-Dehydro-androsterone :



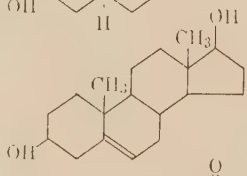
1 HE = 1 mg. : Iso-androstan-diol :



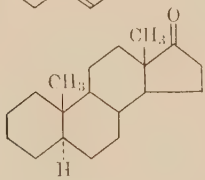
Iso-androsterone :



Inactive : Androsten-diol :



Androstanon :
a.o.



Now remains the question, which is at the same time a cardinal one in the problem under consideration: why is it that just these described factors which determine the character of the chemical groupments and the structure of the sexual hormones should be responsible for the physiological effect and vice versa? It is this question which now shall be dealt with.

On the mechanism of the biological effect of sexual hormones (sterones) in connection with their constitution.

First of all we must realize what should be the meaning of the mechanism of "physiological action" of sterones. This mechanism, in a general way, is built up of a series of subsequently following processes, which finaly provoke in the organism the development of specific biochemical reactions which are responsible for that morphological or functional condition which is characteristic for just the substance which provoked it. It is in this sense that the sexual hormones (sterones) were termed as "chemical factors

of specifically directed (organized) growth'' (Remesov) as the whole multiform display of the manifestation of their action might be unified in one single property: alteration of growth of certain organs, cells and tissues.

But to make it possible for sterones to produce the ''physiological effect,'' that is, to develop in the organism the course of certain reactions, are necessary: firstly—the presence of a substratum, i.e., of certain cells and tissues directed towards their action and evidently determining the primary and secondary sexual features of the organism; secondly—presence of such characteristic groupments in the sterone molecule itself, as would in virtue of their biochemical function, both, secure the penetration of the whole molecule through the semi-permeable cell membrane and simultaneously fix the entire molecule to the substratum. These groups we shall design by *''anchor groups.''* It is quite evident, that even a perfectly active sterone molecule will not be able to produce its effect, if deprived of these groups (p. ex., *desoxoluteosterone,* which evidently, in consequence of above indicated conditions, is inactive). On the contrary, introduction of some more ''anchor groups'' into the sterone molecule, securing fixation and penetration into cells and tissues, sharply increases the activity of the hormone (p. ex.: dihydro-derivatives of the follicular and testicular hormones).

However, the ''anchor groups'' produce their positive effect only in those cases, when their introduction is not hindering but, on the contrary, furthering the setting in of that reaction, which sterone provokes on the substratum. Otherwise they, of course inactivate the hormone, as shown in the instance with luteosterone.

When the factors are present the reaction of the molecule sets in, in the above analyzed sense. *The whole question of the specific action of sterone is mainly determined by that chemical scheme of transformation of sterone in the organism, which, according to the physical and chemical laws, should give the utmost energetical effect.* For the present such schemes could be given, but only hypothetically, when we consider that in biology there is known a sufficient number of precedents which shows, that the organism

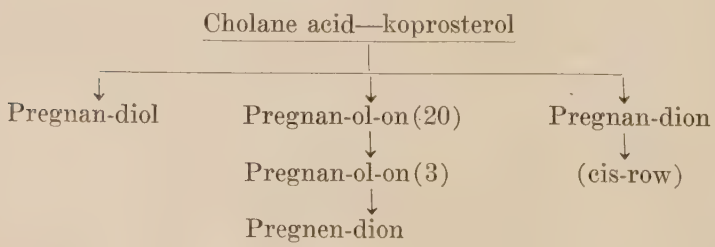
sometimes seems to be rather extravagant and energetical processes are not at all subordinated to the sense of the laws of thermodyamics. Therefore the materials which will be cited below are only of suggestive and preliminary character. They are only meant concretely to exemplify (to illustrate) the theory on specificity of action of sterones being dependent on the structure of the molecule.

To explain the activity of sterone depending on a certain chemical structure, means to find out in each concrete case such a scheme of its splitting in the organism, as would determine the course of reaction *only* in this given structure and in no other one. That can be easily done with luteosterone which posseses the highest degree of specific activity. It is exactly established that only Δ^4-pregnen-dion (3.20) is active, all the other possible combinations being entirely inactive.

In the light of the above described postulates this specificity is to be explained as follows.

The presence of two keto-groups, readily reduceable in the organism and act at the same time as "anchor-groups" (though weaker ones as compared with OH-groups), and particularly of a specifically situated double bond at C_4-C_5-make up those factors which determine the only definite scheme of reactions of transformation of Δ^4-pregnen-dion. No other derivative is able to substitute it in this scheme, because these two indicated factors bring it about, that as soon as luteotserone is formed within, or is introduced in ready form into the organism, the further transformation would immediately set in. We proposed some time ago the following scheme for transformation of sterone.

Scheme for synthesis of luteosterone in the organism.



Scheme for decomposition of luteosterone in the organism.

Δ^4-Pregnen-di-on(3.20)

↓ Allo-pregnan-dion

↓ Allo-pregnan-diol (trans-row)

↓ Allo-pregnan-ol-on(20)

It follows from the latter scheme that the redecomposition of Δ^4-pregnen-di-on follows chiefly the way of formation of trans-saturated isomers which quite agree with its structure and the data of the experiment.

The suggested way of reaction of Δ^4-pregnen-di-on in the organism is characterized by the circumstance, that it is possible *only* in the case when the starting material possesses the exact chemical groupment which is peculiar to Δ^4-pregnen-dion. Neither a single of the known isomers of luteosterone nor its derivatives are able to bring about a similar course of full and energetical reaction, for the maximum liberation of the free energy. And even in general, it would be difficult to detect in the part of known isomers of luteosterone such reaction of transformation which would in a like exhaustive manner unite derivatives and accompanying bodies of this hormone as we observe it in the indicated schemes.

The specificity of physiological effect in luteosterone becomes evident on the basis of this theory. Its dependence on the constitution is dictated by the suggested reaction scheme of sterone on the substratum. As in this reaction the highest importance for the course of the transformation of the sterone itself belongs to the anchor groups "CO-groups", we need not explain why the substitution of some of them by more active anchors "OH-groups"—p.ex., in the case of Δ^4-pregnen-ol(20)-on(3), instead of increasing the activity, on the contrary, leads to a complete loss of it. The molecule might be well fixed on the substratum, but the place, where, the reaction, evidently, is to start is occupied by a group which does not correspond to the scheme.

The correctness of the exposed conception is to my opinion also confirmed by the relations of dependence of activity on structure, in the androsterone row. The structurally analogous to

luteosterone and as to the groupment of the A and B rings entirely identical "*testosterone*" [Δ^4-Androsten-ol(17)-on-(3)] proves to be *the most active* of all the androsterone preparations, even leaving the latter far behind.

"Testosterone" possesses at C_{17} a very active "anchor" (OH-group) which fixes the sterone to the substratum; the CO-group at C_3 and the double bond in the α, β-situation relatively to the latter determines the same potential character of the molecule as in luteosterone. Hydration of testosterone in the organism with analogous reduction of the keto-group leads to the formation of a large series of stereo-isomeric (rings A and B) derivatives of saturated androsterones, many of them being found as accompanying substances of andresterone. Considering the perfect analogy with the luteosterone group, we can easily make sure that neither the isomers, nor the derivatives would be equal to testosterone as to power of action. Principally, the scheme of decomposition of testosterone in the organism should not differ much from the scheme given for luteosterone.

There remains to analyse the cause of specific activity of saturated androsterones, no matter whether obtained as result of transformation of testosterone in the organism, or being formed and decomposed by other ways. This cause, indubitably must be connected with the epimerism of these compounds, on the ground of the above analysed lawfulness of reciprocal spatial disposition of the cis-trans isomeric OH-groups in relation to the cis-trans isomeric groups of rings A and B. Whereby, the essence of the epimeric transformation, which supplies the energy for the physiological effect consists in physico-chemical reactions liberating the energy. This question requires its special study in the light of the exposed theory.

To conclude this communicaiton we wish to add some notes concerning the follicular hormone. From the viewpoint of the above described theory the small specificity of action of this hormone and, particularly, the analogous effect of substances of similar ring structure, is to be explained by the principally similar scheme of decomposition of these compounds in the organism. The

suggestion of a well grounded scheme of decomposition as yet would be premature, the chemistry of this hormone not being sufficiently investigated.

The question of the chemistry of the follicular hormone is inseparably connected with the cardinal questions of the entire chemistry of sterols and first of all cholesterol. The solution of this question will lead to the unveiling of the secret of decomposition of sterols in the organism and to the discovery of the mechanism of their biochemical action, thus being of consequence to biochemistry in general.

However, as doubtless is to be considered, that the basis of the reaction of the follicular hormone is *hydration of the ring structure* and reconvertion of the aromatic ring into a perhydrated one. That this process might be performed by degrees is proved by the protracted action of esters of the hormones in the organism, whereby the reaction probably, begins from the blockaded ring "A" where low saponification liberates the ring and makes it accessible to the influence of the substratum. Thus the role of the esterifying factor is not only that of an "anchor", but in a certain way also that of a "protector".

The enormous thermodynamical effectiveness of hydration of the rings in compounds of the follicular sterone type explains the high activity in very small doses.

In conclusion we may briefly remember, that, if the study and the investigation of the transformation scheme of sterones in the organism should lead to the elucidation of the mechanism of specific dependence on the molecular structure, all the details of the hormone action will be finally explained by the disclosure of the mechanism of action of the "anchor" and "protector" groups in the organism.

A great deal is to be expected in respect to these latter from the study of the problem of biological permeability, whereby the methods which will be applied to this study must be for the most part, of physico-chemical character, as we shall have to deal with a complex of phenomena which are connected with colloid-dispersal systems of cells and tissues of the living organism.

Summary.

On the ground of facts, obtained in the chemistry of sexual hormones as to the dependence of the specific biological effect on the chemical structure of hormones, we suggested and developed on an example with luteosterone *"a theory of specific action of sterones depending on their structure"*. The fundamental idea of this theory is, that certain groupments (*"anchor"* and *"protector"* groups) in the sterone molecule, conduct and fix the latter in the organism on a certain substratum (cells and tissues directed to the effect of action of these compounds). After that the *chemical reaction* of sterone on the substratum will be realized and produce the characteristic physiological effect. The reaction represents nothing other than a further biochemical transformation of sterone in the animal or vegetable organism. The reaction is to be interpreted as any other biochemical reaction, i.e. as the liberation of a certain amount of energy and completion of a certain circular process of chemical transformations of the hormone. The ways by which this chemical reaction of sterone is going on in the organism, are determined either by the maximum work gained in its issue, or by the conditions of ana-katabolism of kindred substances of the sterones, this reaction making part of the general metabolism.

The scheme of similar chemical transformations of sterones in the organism as to its specificity must correspond to the structural specificity of the initial hormone and shall not have, as will as this latter, precedents in the row of derivatives or other compounds. A scheme was found for luteosterone, and analysed from the viewpoint of this theory. In the same sense can be explained the specific action of substances of the androsterone group, as well as the relatively slight specificity of action of the follicular hormone.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

GEWEBSOXYDATION DER NUKLEINSÄURE. II.

Über die fermentative Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Muskel.

Von

YUKIO TSUGE.

(*Aus der medizinischen Klinik im Dairen-Hospital, Dairen, Süd-Mandschurei. Direktor: Prof. Dr. K. Morinaka.*)

(Eingegangen am 13. April 1936)

In der ersten Mitteilung (1935) „Gewebsoxydation der Nukleinsäure" ist die Frage der Einwirkung von Hefenukleinsäure auf Dehydrierungsvorgänge studiert worden. Es konnte gezeigt worden, dass verschiedene frische Organgewebe von Kaninchen Nukleinsäuredehydrase besitzen. Ihre Wirkung ist am stärksten im unteren Dünndarm. Auch Lebergewebe zeigt eine relativ starke Wirkung der Nukleinsäuredehydrase.

Im Jahre 1925 hat Y. Harada den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Milchsäure. Bernsteinsäure und Apfelsäure auf die Muskeldehydrasen festzustellen versucht, mit dem Ergebniss. dass der frische Muskel Milchsäuredehydrase besitzt. Die cofermentarme Muskulatur wird durch höhere Konzentrationen der Milchsäure aktiviert. Die Bernsteinsäuredehydrase wirkt zwar auch in niederen Konzentrationen, wird aber durch Auswaschen wenig alteriert und durch höhere Bernsteinsäurekonzentrationen nicht beeinflusst. Die Apfelsäure hemmt die Muskeldehydrase. Der Trockenmuskel besitzt noch Bernsteinsäuredehydrase und Milchsäuredehydrase, die aber beide nicht identisch zu sein scheinen, da die Bernsteinsäurehydrase aktiver ist. Die Apfelsäure hemmt auch im Trockenmuskel Milchsäurehydrase.

Der Nukleinsäurestoffwechsel ist bis heute noch nicht völlig geklärt. Der fermentative Abbau der Nukleinsäure im Organismus bis zu den Endbausteinen (Purin-bzw. Pyrimidinbasen, Kohlenhydrat und Phosphorsäure) war Gegenstand zahlreiche Arbeiten. Wir haben uns zum Ziele gesetzt, das Vorkommen und die Quantität von Fermenten in verschiedene Organen verschiedener Tiere, die verschiedene Abbaustufen des Nukleinsäureabbaus weiter ver-

wandeln, festzustellen. Die Grundlage solcher Untersuchungen ist die genaue Festlegung der Bedingungen, unter denen sich die fermentative Spaltung vollzieht. Ich bin der Ansicht, dass nicht ein Fermentkomplex sondern mehrere spezifische Fermente für die einzelnen Phasen des intermediären Nukleinstoffwechsels in Frage kommen. Zur Prüfung dieser Ansicht habe ich eine Untersuchung über die Verteilung der Fermente des Nukleinsäureabbaus (Nukleinsäuredehydrasen) in verschiedenen Organen verschiedener Tiere durchgeführt.

Im folgenden wollen wir den Einfluss der Hefenukleinsäure auf die fermentative Dehydrierung im Muskelgewebe prüfen.

Versuchsteil.

Die Methodik ist die gleiche, wie sie in der früherer Arbeit zur Anwendung kam. Das Evakuieren mittels Wasserstrahlpumpe dauerte stets 1 Minute. Sofort versenkte ich dann das Vakuumröhrchen in das Wasserbad. Die Temperatur im Thermostaten wurde auf 37° konstant gehalten. Zur Darstellung der rohen Fermentpräparate wird der Muskelbrei in dem dem 10 fachen seines Gewichtes entsprechenden Volumen Phosphatpuffer suspendiert. Es genügt Schütteln bei Zimmertemperatur. Nach einmaliger Filtration durch Gaze ist der Extrakt verwendbar.

Zur Gewinnung eines Trockenpräparates nach dem Verfahren v. Euler wird frischer Muskelbrei mit der 10 fachen Menge 96 proz., gut gekühlten Alkohols verrührt und nach etwa 5 Minuten auf einer grossen Nutsche über Filtrierpapier abgesaugt, und dann noch einmal der gleichen Behandlung mit Alkohol unterworfen. Nun wird das Material einmal mit der 10 fachen Menge Äther durchgerührt. Dann saugt man den Äther scharf ab. Das pulverige Material wird an der Luft in einer grossen Petrischale getrocknet. Durch Extraktion des Pulvers mit der 10 fachen Menge Phosphatlösung bei 40° während 1/2 Stunde, erhält man eine wirksame Fermentlösung.

Im allgemeinen wurden 0,5 ccm Muskelextrakt (enthaltend 0,15 g Gewebe in 1,5 ccm Phosphatpuffer P_H 7,1) : 0,3 ccm Methylenblaulösung in der Konzentration von 1 : 10000 : 0,4 ccm

Substrat-139 mg. Hefenukleinsäures Natrium (Merck) mit destilliertem H_2O auf 10,0 ccm aufgefüllt. Versuchstemperatur 37°.

Ph-*Optimum der Dehydrierung in dem Muskelextrakt.*

Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ist eine wesentliche Veränderung des Ph (6,4 6,6 7,0 7,4 7,6 8,0 8,3) durch den Prozess der Dehydrierung im Kaninchenmuskel ausgeschlossen. Bei Ph 6,4 und 6,6 wurde die Acidität mit $n/10$ Acetatgemischen, von Ph 7,0 bis 7,6 mit $m/15$ Phosphatmischungen, im stark alkalischen Gebiet Ph 8,0 und 8,3 mit $n/10$ Boratgemischen nach Sörensen eingestellt.

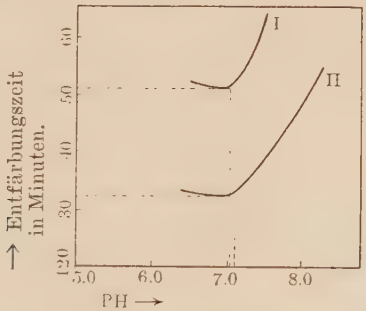


Fig. 1. I. Ungewaschen. II. Gewaschen.

Der Verlauf der Ph-Aktivitätskurve zeigt also, dass man die Erreichung des Ph-Optimums etwa bei 7,0, 7,1 im schwachalkalischen Gebiet hat.

Versuch an Normalitieren.

Tabelle I.

0,5 ccm Kaninchenmuskelextrakt, Phosphatlösung Ph 7,1.
0,3 ccm Methylenblaulösung (1 : 10000) Temperatur 37°.
0,4 ccm Hefenukleinsäurelösung.

Vakuumrohr-Nr.		1	2	3	4	5	6
Entfärbungszeit in Min.	Unausgewaschen	152	147	150	154	152	∞
	Ausgewaschen	134	141	143	125	132	∞

Nr. 6 zeigt Kontrolle mit Wasser zugesetzt.
∞ Nach 5 Stunden keine Entfärbung.

Überblicken wir diese Versuche, so zeigt der ausgewaschene Kaninchenmuskel gegenüber dem ungewaschenen eine Erhöhung der Dehydrierung (Auswaschung des Hemmungskörper ?.)

Tabelle II.

Muskel, 3 und 7 Stunden nach dem Tode der Leiche entnommen, diente zu diesem Versuch. Gleiche Versuchsanordnung wie oben.

Vakuumrohr-Nr.		1	2	3	4	5	6
Zeit post mortem		3 Stunden post mortem			7 Stunden post mortem		
Entfärbungszeit in Min.	Unausgewaschen	168	175	171	188	192	182
	Ausgewaschen	156	160	159	164	168	171

Dieser Versuch lässt sich im Sinne einer Verschiebung der Entfärbungszeit im frischen Muskel gegenüber dem nicht frischen Muskel (3 und 7 Stunden nach dem Tode) ausdeuten.

Versuche an Meerschweinchen.

Versuchsanordnung die gleiche wie am Kaninchenmuskel, Normale Ernährung.

Tabelle III.

Vakuumrohr-Nr.		1	2	3	4	5	6
Entfärbungszeit in Min.	Ungewaschen	133	130	141	140	128	∞
	Gewaschen	112	125	118	131	122	∞

Bei Vergleich der Befunde der Tabelle III und Tabelle I lässt sich ein geringer Unterschied hinsichtlich der Dehydrasewirkung feststellen.

Tabelle IV.

Vakuumrohr-Nr.		1	2	3	4	5	6
Zeit post mortem		3 Stunden post mortem			7 Stunden post mortem		
Entfärbungszeit in Min.	Ungewaschen	146	148	151	183	191	177
	Gewaschen	129	133	127	148	142	150

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie in Tabelle III.

Gang gleichsinnig varlaufen wie in Tabelle II.

Tabelle V.

0,5 ccm Trockenmuskelextrakt: 1,0 g Trockenmuskel wurde mit 1,0 ccm Phosphatlösung extrahiert. Sonst wie in Tabelle I.

Vakuumrohr-Nr.		1	2	3	4	5	6
Entfärbungszeit in Min.	Kaninchen	186	190	177	181	184	Nach 4 Std. Keine Entf.
	Meerschweinchen	162	157	165	159	163	„

Das Resultat dieses Versuches ist, dass die Muskel-Nukleinsäuredehydrogenase in ihrer Wirkung gegenüber der Hefenukleinsäure durch die Trocknung des Muskels nicht vernichtet wird, jedoch zeigte sich keine so starke Dehydrogenasewirkung wie beim frischen Muskel.

Aus der vorliegenden Untersuchung lässt sich schliessen: Der frische Muskel besitzt Nukleinsäurehydrase. Die (durch Auswaschen) cofermentarme Muskulatur besitzt etwas höhere Dehydrasewirkung als der ungewaschene Muskel. Durch Muskel, der nicht direkt nach dem Tode entnommen war, wurde noch Nukleinsäure durch Dehydrogenase oxydiert. Der Trockenmuskel (der nicht mehr atmet) besitzt noch eine wirksame Nukleinsäuredehydrogenase. Die Dehydrasewirkung im Muskel durch Nukleinsäure ist beim Meerschweinchen stärker als beim Kaninchen.

Dem hochverehrter Herrn Prof. E. Abderhalden, möchte ich auch an dieser Stelle für seine schriftliche Hilfe und manche wertvollen Ratschläge meinen herzlichsten Dank aussprechen.

LITERATUR.

Tsuge, Y. (1935): Fermentforschung, **14**, 4.
Harada, Y. (1925): Biochem. Zsch., **164**, 271.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

GEWEBSOXYDATION DER NUKLEINSÄURE. III.

Über fermentative Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Blute.

Von

YUKIO TSUGE.

(*Aus der medizinischen Klinik im Dairen-Hospital, Dairen, Süd-Mandschurei. Direktor: Prof. Dr. K. Morinaka.*)

(Eingegangen am 13. April 1936)

In der I. Mitteilung über „Gewebsoxydation der Nukleinsäure" ist die Frage der Einwirkung von Hefe-Nukleinsäure auf Dehydrierungsvorgänge studiert worden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene frische Organgewebe von Kaninchen Nukleinsäuredehydrase besitzen. Die Dehydrogenasewirkung durch Hefe-Nukleinsäure ist am stärksten im Dünndarm.

Die Ansicht, dass die Hefe-Nukleinsäure aus vier Mononukleotiden—Adenylsäure, Guanylsäure, Uridylsäure, Cytidylsäure—aufgebaut (Poly-nukleotid) ist, darf heute als gesichert hingestellt werden. Das Konstitutionsschema nach Levene ist folgendes:

```
      OH
      |
HO—PO—Ribose—Adenin

      HO—PO—Ribose—Uracil
             |
           HO—PO—Ribose—Guanin
                  |
                HO—PO—Ribose—Cytosin
```

Der Abbau des Poly-nukleotid unter der Einwirkung der spezifischen Fermente vollzieht sich folgendermassen: Zunächst wird die Bindung zwischen den Kohlenhydrat-Phosphorsäureketten gelöst, so dass die Mono-nukleotide frei werden. Diese Spaltung, die wahrscheinlich zum Teil schon im Darm und auch in der Blutbahn stattfindet, wird durch ein Ferment bewirkt, das die Autoren als Nukleinase (Nuklease) bezeichnet haben. Die Bedeutung der Stoffwechselfermente im Blut sind schon vielfach studiert

worden, und zwar hat man Amylase, Lipase, Maltase, glykolytisches Ferment, Protease, Katalase, Nuklease, Peroxydase und Phosphatase darin nachgeweisen. In der folgenden Arbeit ist es uns erstmalig gelungen, nachzuweisen, dass frisches Blut (rote Zellen, Serum) vom Menschen in geringer Menge Nukleinsäuredehydrase besitzt.

Bekanntlich ist durch zahlreiche Arbeiten gezeigt worden, dass die in den Geweben vorhandenen Oxydationsfermente, die Dehydrogenase (im Sinne Wielands), aus Wasserstoffdonatoren, aktiven Wasserstoff abspalten, welcher auf das Methylenblau überführt wird, und dessen Leucoverbindung reduziert. Bei dieser künstlichen Reduktion spielt Methylenblau dieselbe Rolle als Wasserstoffakzeptor wie der molekulare Sauerstoff beim physiologischen Verlauf in vivo, im Sinne des Schemas:

AH_2 (Wasserstoffdonator) + O_2 (Wasserstoffakzeptor) →
$A + H_2O_2 = AH_2$ + Methylenblau—(Dehydrogenase) →
$A + H_2$ Methylenblau (Leucoverbindung)

Bertho schreibt, dass das dabei primär entstehende Hydroperoxyd durch die in allen aeroben Zellen vorkommende Katalase, die damit bei der Zellatmung erhielt, in Wasser und Sauerstoff zerlegt werden sollte. An Stelle des Sauerstoffs werden bei der Untersuchungsmethodik zellfremde Wasserstoffakzeptoren, wie z. B. Methylenblau (Methylenblautechnik nach Thunberg-Ahlgren), Chinon u.a. benutzt. Über die Atmungsvorgänge im Blut entwickelte O. Warburg folgende Vorstellung: das sauerstoffübertragende Fermenthämin oxydiert in lebenden Zellen die Brennstoffe. Der Oxydation durch Hämineisen muss in der Zelle eine Wirkung auf die Brennstoffe vorausgehen. Diese Wirkung wird in der Wielandschen Atmungstheorie „Wasserstoffaktivierung" genannt.

Im folgenden wurde der Versuch unternommen, den Einfluss von Hefe-Nukleinsäure auf die Dehydrierung im Blut durch die Methylenblaumethode festzustellen.

Experimentelles.

Die Methodik wurde nach Thunberg-Ahlgren ausgeführt.

Die Blutzellen von 5,0 ccm gesundem Menschenblut, durch Schütteln defibriniert, werden in 0,9%iger Kochsalzlösung mehrmals auf Zentrifuge gewaschen, scharf zentrifugiert und das Zellsediment cytolysiert, indem man mit Wasser auf das ursprüngliche Blutvolumen auffüllt. Dann wurden die Stroma wieder durch Zentrifugieren mit Phosphatlösung P_H 7,2 entfernt. Die klare hellrote, stromafreie Flüssigkeit wurde in einer Menge von 1,0 ccm in eine Thunbergsche Vakuumröhre abpipettiert. Dazu wurden zentration von 1:10000 und 1,0 ccm hefenukleinsaures Natrium 0,5 ccm Methylenblaulösung (purissimum-Höchst) in der Kon-

Tabelle I.

Reaktionsgemisch: Hellrote Flüssigkeit 1,0 ccm; Methylenblaulösung (1:10000) 0,5 ccm; 0,25% Hefenukleinsaures Natrium (Merk) 1,0 ccm; Temperatur 37°.

Versuch		I	II	III
		Donator: 0,25% Hefenukleinsaures Na.		
		Entfärbungszeit in Stunden		
		° ′	° ′	° ′
Vakuumrohr Nr.	1	10 25	9 53	10 11
	2	10 08	10 05	10 16
	3	10 19	9 57	10 10

Kontroll: nach 20 Stunden noch nicht entfärbt.

Tabelle II.

Reaktionsgemisch: Methylenblaulösung (1:10000) 0,3 ccm.
Hellrote Flüssigkeit 1,5 ccm.
Sonst wie in Tabelle 1.

Versuch		I	II	III
		Donator: 0,25% Hefenukleinsaures Na.		
		Entfärbungszeit in Stunden		
		° ′	° ′	° ′
Vakuumrohr Nr.	1	7 27	7 18	7 25
	2	7 05	7 21	7 14
	3	7 13	7 23	7 17

Kontrolle: nach 16 Stunden noch nicht entfärbt.

(Merck) Gef. N 16,4 zugesetzt. Dann wurde die Röhre unter Manometerkontrolle mittels Wasserstrahlpumpe evakuiert, in ein Wasserbad (Thermostat) eingetaucht und die Entfärbungszeit des Methylenblaus gemessen.

Tabelle III.
Gleiche Versuchsanordnung.

Versuch		I	II	III
		Donator: 0,25% Hefenukleinsaures Natr.		
		Entfärbungszeit in Stunden		
		° ′	° ′	° ′
Vakuumrohr Nr.	1	7 10	7 21	7 02
	2	7 24	7 08	7 11
	3	7 15	7 01	7 16

Kontrolle: nach 14 Stunden noch nicht entfärbt.

Wir fanden, dass die Hefe-Nukleinsäure in der hellroten Flüssigkeit durch Dehydrogenase oxydiert wird, wenn Methylenblau als Oxydationsmittel zur Verfügung steht. Die Methylenblaureduktion in zytolysierten roten Blutzellen wird um so stärker, je kleiner die Konzentration des Methylenblaus ist. Im Gegensatz zu Methylenblau ist molekularer Sauerstoff nicht imstande, Hefe-Nukleinsäure in cytolysiertem Blut zu oxydieren. Zum Beleg dieser wichtigen Tatsache dient der vorige Versuch.

Es kann wohl kein Zweifel mehr daran bestehen, dass das menschliche Blutserum verschiedene Fermente enthält. Man könnte nunmehr annehmen, dass die enzymatische Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Blutserum hervortritt. Zum Beleg dient der folgende Versuch:

Zur Gewinnung von Blusterum wurde das Blut in Zentrifugierbecher aufgefangen und nach dem Gerinnen etwa 30 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurde vom Blutkuchen abgegossen, nochmals etwa 25 Minuten zentrifugiert, wiederum abgegossen und 25 Minuten zentrifugiert. Man erhält so ein klares, rein gelbes und blutkörperchenfreies Serum. Dazu wurden kurz vor dem Versuch gleiche Menge der Phosphatlösung zugesetzt. Das so behandelte

Serum wurde meist frisch verarbeitet.

Tabelle IV.

Reaktionsgemisch: 1,0 ccm Blutserum, das nach obigem Verfahren hergestellt war. Sonst wie in Tabelle I.

Versuch		I	II	III
		Donator: 0,25% Hefenukleinsaures Na.		
		Entfärbungszeit in Stunden		
		° ′	° ′	° ′
Vakuumrohr Nr.	1	5 57	5 43	5 48
	2	6 00	5 47	5 41
	3	5 52	5 50	5 55

Kontrolle: nach 12 Stunden noch nicht entfärbt.

Tabelle V.

Gleiche Versuchsanordnung.

Versuch		I	II	III
		Donator: 0,25% Hefenukleinsaures Na.		
		Entfärbungszeit in Stunden		
		° ′	° ′	° ′
Vakuumrohr Nr.	1	5 53	5 41	5 51
	2	5 45	5 56	5 58
	3	5 49	5 47	5 40

Kontrolle: nach 14 Stunden noch nicht entfärbt.

Versuch mit Kaninchenblut.

Normalen Versuchskaninchen wurden ungefähr 5 bis 8 ccm Blut aus den Ohrvenen entnommen, nachdem daselbst durch Bestreichen mit Xylol eine starke Hyperämie erzeugt wurde. Die Versuche wurden von uns gleich wie beim Menschenblut ausgeführt, mit dem Resultat, dass nach 20 Stunden Methylenblauentfärbung noch nicht hervortritt.

Aus den vorliegenden Tatsachen dürfen wir daher abschliessend sagen: Im menschlichen Blutserum und in cytolysierten roten

Blutzellen mit der Thunbergschen Methylenblauentfärbungsmethode kann eine geringe Dehydrasewirkung durch Hefe-Nukleinsäure nachgewiesen werden kann. Es zeigt sich, dass diese Dehydrasewirkung etwas stärker im Blutserum als bei den roten Blutzellen ist. Diese spezifische Dehydrogenase hat beim Kaninchenblut unter unseren Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Methylenblaureduktion.

Herrn Prof. Grassmann danke ich für seine schriftliche Hilfe bei dieser Arbeit.

LITERATUR.

Bertho, A. (1929–1934): Fortschritte der physiologischen Chemie, **198**.
Levene und Simms (1926): Journ. biol. Chemistry, **70**, 332.
Tsuge, Y. (1935): Fermentforschung, **14**, 4.
Warburg O. und Christian, W. (1931): Biochem. Zeitschr., **242**, 206.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 1.

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHEN FERMENTE DER PANKREASDRÜSE DES KANINCHENS.

1. Mitteilung: Über die proteolytischen Fermente des Mazerationssaftes von Pankreas und Dünndarmschleimhaut des Kaninchens.

Von

FUYUTARO ITZIOKA.

(*Aus dem Utzino-Laboratorium des Institutes für Chemie an der Kaiserlichen Universität Kyoto. Vorstand: Prof. S. Utzino.*)

(Eingegangen 25. Juni 1936.)

Der neue grosse Aufschwung auf dem Gebiete der Enzymforschung ist wohl dem erfolgreichen Betrieb der Willstätter-Schule (1928) zu verdanken. Die Untersuchungen der Proteinasenwirkungen beziehen sich aber in der Hauptsache auf die aus Pankreas und Dünndarmschleimhaut des Schweins oder des Rindes hergestellten Materialien. Zum Vergleich hat der Verfasser in der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. S. Utzino das Verhalten des Pankreas- und Dünndarmschleimhautenzyms des Kaninchens gegenüber Proteinen, Peptiden und Peptidderivaten studiert, und zwar wurden hier die proteolytischen Wirkungen des Mazerationssaftes der Pankreasdrüse sowie der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens untersucht.

Durch die Casein- oder Gelatinehydrolyse wurde wie beim Schwein und Rind die aktive Trypsinwirkung des Mazerationssaftes des Kaninchens festgestellt (Tabelle I). Die Wirkung musste sich schon fast im Stadium der Vollaktivität befinden, da sie beim Behandeln mit Kinasepulver oder Kinaselösung nicht mehr deutlich verstärkt wurde. Die Caseinhydrolyse trat in einem ziemlich breiten Bereich der Reaktion (P_H 6,0–8,0) auf. Es sei hier noch erwähnt, dass eine ziemlish starke Caseinhydrolyse (sowie eine etwas schwache Gelatinehydrolyse) auch bei schwach saurer Reaktion beobachtet wurde. Um festzustellen, ob diese Wirkung in Beziehung zur katheptischen Wirkung der Pankreasdrüse steht, wurden die Versuche bei verschiedener saurer Reaktion angestellt

(Tabelle II). Nach den Ergebnissen werde kein besonderer Anstieg der Aciditätszunahme bei PH 4,0–PH 5,0 beobachtet. Auf die Caseinhydrolyse durch den Mazerationssaft hatte Cysteinzusatz (1930) keinen Einfluss.

In Bezug auf die Optimalreaktion der Enzymlösung, besonders im Falle von Rohmaterial, dürfte es berechtigt sein, einen Optimalbereich anzunehmen, worauf seinerzeit bereits E. Abderhalden (1929) hingewiesen hat, insofern die Wirkung von irgendeinem Enzymkomplex durch die verschiedenen Bedingungen (Enzymgeschichte, Art und Menge der Substanz, Mediumbestandteile oder Digestionsdauer etc.) mehr oder weniger im quantitativen Sinne beeinflusst werden kann.

Bei den Versuchen mit beiden Albuminen (Ovo- und Serumalbumin von E. Merck) wurde keine Aciditätszunahme beobachtet.

Was das inaktive Trypsin im Pankreassaft, seine Aktivierung sowie sein Wirkungsoptimum anbetrifft, so soll hierüber noch eingehend in den folgenden Abhandlungen berichtet werden.

Die Peptidasewirkung des Mazerationssaftes vom Kaninchenpankreas wurde hier, wenn auch nur in schwachem Grad, sicher festgestellt (Tabelle III). Die günstige Hydrolyse des Diglycins trat bei PH 7,5–8,0 auf und die des Leucyglycins bei PH 7,0–8,0.

Die Frage aber, ob diese Peptidasewirkung bereits vom Drüsensekret als die eines diesem eigentümlichen Enzyms ausgeht, ist noch eine offene, da es sich hier auch um die Wirkung von Gewebspeptidase handeln kann, die bei der Mazeration in den Saft gelangen kann. Hier ist nur zu erwähnen, dass, falls der Mazerationssaft mit einer kleinen Menge Darmschleimhautpulver versetzt wurde, kein Einfluss auf die Peptidasewirkung zur Beobachtung kam.

Weder Benzoylglycin noch Benzoyldiglycin wurden durch die Enzymlösung angegriffen, während Benzoylleucylglycin durch diese hydrolysierbar ist (Tabelle IV).

Chloracetylphenylalanin, Chloracetyltyrosin und Bromisokapronyldiglycin wurden durch die Enzymlösung gespalten, Bromisokapronylglycin dagegen nicht (Tabelle V).

Die Spaltbarkeit des Benzoyl- sowie Phtalyldiglycins durch den Pankreasmazerationssaft des Schweins ist schon seinerzeit von S. Utzino (1928) nachgewiesen worden. Unabhängig von Utzino haben auch E. Waldschmidt-Leitz und seine Schüler (1928) eine solche Wirkung des Pankreasauszugs festgestellt, indem sie durch das Adsorptionsverfahren das Enzym von der Proteinase und von der Aminopolypeptidase trennten. Sie nannten das Enzym Carboxypolypeptidase. Nach den obigen Ergebnissen ist das Histozym im Pankreagewebe des Kaninchens sehr wahrscheinlich auszuschliessen.

Obgleich das hier im Betracht kommende Enzym ähnlich dem von E. Waldschmidt-Leitz Carboxypolypeptidase genannten Enzym ist, besteht doch ein gewisser Unterschied darin, dass sich die Wirkung auf die Spaltung bestimmter Substrate (Chloracetylaminosäuren und gewisse Acyldieptide) beschränkt. Man könnte hier auch eine Halogenacylase im Sinne von E. Abderhalden (1929) annehmen. Darauf möchte der Verfasser in den folgenden Abhandlungen bei den Versuchen mit dem Pankreassaft des Kaninchens noch eingehender zurückkommen.

Der Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens greift deutlich sowohl Casein und Gelatine als auch Diglycin und *dl*-Leucylglycin an (Tabelle VI).

Als Optimalbereich für die Eiweisshydrolyse fand sich P_H 7,0–8,0. Das Optimum lag für die Caseinhydrolyse bei P_H 7,5 und für die Gelatinehydrolyse bei P_H 8,0. Der Optimalbereich für die Diglycinhydrolyse war P_H 7,5–8,0, für die Leucylglycinhydrolyse 7,0–7,5. Hier muss es sich um ein aktives Trypsin und ein Darmerepsin handeln. Es ist noch zu bemerken, dass in einer kurzen Digestionszeit die Leucylglycinhydrolyse bei P_H 6,5 schwächer als bei P_H 7,0 auftrat, etwas später schon aber fast so starke Aciditätszunahme wie bei P_H 7,0 aufwies.

Das Dünndarmschleimhautenzym des Kaninchens griff ganz wie das des Rindes und des Schweins weder Benzoylglycin noch Benzoyldiglycin an. Auch Bromisokapronylglycin wurde nicht hydrolysiert. Chloracetylphenylalanin und Chloracetyldiglycin wurden mehr oder weniger angegriffen.

Experimenteller Teil.

Enzymlösung: Entweder der Brei von zerriebenem Pankreas oder von ausgekratzter Dünndarmschleimhaut des Kaninchens wurde im Mörser mit dem drei-, vier- oder sechsfachen Volumen Glycerin-Wasser (6:4) gut zerrieben, durch ein feines Sieb koliert und dann im Eisschrank aufbewahrt.

Für die Aktivierungsversuche wurden je 10 ccm dieser Enzymlösung mit 0,1 g Kinasepulver oder mit 10 ccm Kinaselösung versetzt und 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Als Kinasepulver wurde das durch Aceton-Äther getrocknete Dünndarmschleimhautpulver des Kaninchens verwendet. Eine sehr schwache Erepsinwirkung des Pulvers ist nicht ausgeschlossen.

Die Kinaselösung, welche keine Erepsinwirkung mehr aufwies, wurde nach der Methode von E. Waldschmidt-Leitz und O. Shinoda (1928) hergestellt.

Versuchsansatz: Bei dem Hauptversuche handelte es sich entweder um 1%ige Eiweisslösung oder 1/20 Mol Peptid- bzw. Peptidderivatlösung in Pufferlösungen verschiedener P_H-Konzentration. Die Acylderivate wurden zuerst durch Zusatz der berechneten Mengen von Normal-Alkali als Alkalisalze aufgelöst.

Je 20 ccm Substratpufferlösung wurden mit 2, 3 oder 4 ccm Enzymlösung versetzt und unter Zusatz von etwas Toluol bei 37° digeriert.

Als Kontrolle wurde Enzym-Pufferlösung ohne Substrat unter den gleichen Bedingungen wie beim Hauptversuch der Digestion unterworfen.

Nach einer gewissen Zeit wurde die Aciditätszunahme in 4 ccm nach Sörensen oder die NH_2-N Zunahme in 1 ccm Digestat (Digestionlösung) nach van Slyke bestimmt.

In den Tabellen sind die Differenzen zwischen den beim Hauptversuche und beim Kontrollversuche gefundenen Zahlen angegeben.

I. *Eiweiss-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens.* (Tabelle I).

Der Mazerationssaft A bestand aus 1 Teil Pankreasbrei und

TABELLE I.

Eiweiss-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens.

Substrate 20 ccm	Mazerationssaft	Stunden Zeit	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH) PH 5.0	6.0	6.5	7.0	7.2	7.5	7.7	8.0	8.5
Casein (1%) (Hammersten)	C. 3 ccm	4			0.31	0.30	0.26	0.29	0.31	0.29	0.23
		8	—	—	0.63	0.70	0.65	0.65	0.56	0.64	0.47
		24			1.36	1.39	1.34	1.27	1.29	1.32	1.21
	C. 3 ccm	2	0 (5,0)	0.28 (6.2)		0.30 (6.6)		0.29 (7.3)	0.11 (7.8)		
		4	0 (4.8)	0.58 („)	—	0.61 (7.0)	—	0.55 (7.4)	0.44 („)	—	—
		8	0 (5.0)	1.01 („)		1.01 („)		1.01 (7.3)	1.00 („)		
	A, verdünnt mit 0.8% Kochsalzlösung (1 : 1) 4 ccm	5		0.67		0.67				0.60	
		24	—	0.90	—	0.97	—	—	—	0.80	—
		72		1.20		1.21				1.04	
	A, aktiviert mit Kinaselösung (1 : 1) 4 ccm	5		0.78		0.31				0.75	
		24	—	1.03	—	1.09	—	—	—	0.96	—
		72		1.27		1.33				1.26	
Gelatine (1%)	C. 3 ccm	4			0.01	0.03	0.03	0.03	0.08	0.06	0.03
		8	—	—	0.28	0.43	0.45	0.38	0.38	0.28	0
		24			0.63	0.70	0.76	0.70	0.68	0.58	0.22
	C. 3 ccm	2	0.01 (4.8)	0.03 (6.0)	0.11 (6.4)	0.13 (6.9)			0.07 (7.7)		
		4	0.04 („)	0.12 („)	0.31 („)	0.31 („)	—	—	0.12 (7.6)	—	—
		8	0.04 (5.0)	0.28 (6.3)	0.34 („)	0.41 (7 0)			0.22 (7.8)		
	A, verdünnt mit 0.8% Kochsalzlösung (1 : 1) 4 ccm	5		0.16		0.32				0.32	
		24	—	0.40	—	0.56	—	—	—	0.50	—
		72		0.51		0.76				0.63	
	A, aktiviert mit Kinaselösung (1 : 1) 4 ccm	5		0.16		0.38				0.32	
		24	—	0.38	—	0.59	—	—	—	0.42	—
		72		0.51		0.78				0.63	
Ovoalbumin (E. Merck)	C. 4 ccm	4				0		0.01		0	
		8	—	—	—	−0.08	—	−0.01	—	0.01	—
		24				−0.02		−0.05		0.04	
Serumalbumin (E. Merck)	C. 4 ccm	4				0		0		0	
		8	—	—	—	−0.10	—	−0.10	—	−0.08	—
		24				−0.33		−0.05		−0.07	
Caseinopepton	C. 4 ccm	4				0.45		0.44		0.28	
		8	—	—	—	0.63	—	0.64	—	0.57	—
		24				0.62		0.76		0.84	

dem 3-fachen Volumen Glycerin-Wasser (6:4); der Mazerationssaft C aus 1 Teil Pankreasbrei und dem 6-fachen Volumen Glycerin-Wasser.

Um die Aktivität des Mazerationssaftes zu prüfen, wurde der Mazerationssaft A mit dem gleichen Volumen Kinaselösung versetzt und bei Zimmertemperatur 30 Min. stehen gelassen. Zum Vergleich wurde der Saft anstatt mit Kinaselösung mit dem gleichen Volumen der physiologischen Kochsalzlösung behandelt. 4 ccm dieser Lösung wurden je 20 ccm Substratlösung zugesetzt. Die Aktivität des Mazerationssaftes nahm durch den Kinaselösungzusatz ungefähr nur um 10–20% zu.

Bei den Versuchen mit Albuminen fiel die durch Abziehen der Kontrollzahl gewonnenen Zahl manchmal negativ aus oder überschritt sogar die negative Fehlergrenze. Über den Einfluss des Albuminzusatzes wird demnächst an anderer Stelle berichtet.

II. Casein-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens. (Tabelle II)

Versuchansatz: 20 ccm 1%iger Caseinlösung +3 ccm Mazerationssaft C. Die Zahlen in den Klammern geben die bei jeder Bestimmung nochmals geprüften PH-Werte an.

Hier ist noch zu erwähnen, dass die Aciditätszunahme der Caseinhydrolyse bei PH 5,5 schon in 5 Std. einen ziemlich grossen Wert erreichte, die der Gelatinehydrolyse aber nicht.

III. Peptide-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens. (Tabelle III)

Die Herstellung vom Mazerationssaft A und C ist schon in der Tabelle I angegeben. Auch hier sind die nochmals geprüften PH-Werte des Bestimmungsansatzes der Digestatlösung angegeben.

IV. Acylpeptide-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens. (Tabelle IV)

Der Mazerationssaft B wurde mit dem 4-fachen Volumen Glycerin-Wasser (6:4) hergestellt. Bei den Versuchen mit Benzoyldiglycin und Benzoyl-*dl*-leucylglycin bei PH 7,5 (4 ccm mit

TABELLE II.

Eiweiss-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens.

Substrate (1%) 20 ccm	Mazerationssaft	Zeit Stunden	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 *n*-NaOH)								
			PH								
			3.0	4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
Casein	C. 3 ccm	5	0 (3.0)	0.05 (4.0)	0.11 (5.0)	0.62 (5.4)	0.77 (5.8)	0.87 (6.5)	0.82 (7.2)	—	0.80 (8.0)
		8	0.03 (3.0)	0.01 (4.0)	0.14 (4.7)	0.82 (5.4)	0.98 (5.8)	1.06 (6.7)	1.02 (7.3)	—	0.95 (7.8)
		24	0 (3.0)	0 (4.0)	0.35 (4.6)	1.10 (5.5)	1.17 (5.9)	1.35 (6.7)	1.12 (7.3)	—	0.97 (8.0)
	C. 3 ccm	1	—	0 (4.0)	0 (5.0)	—	0.02 (6.2)	0.02 (6.8)	0 (7.2)	—	0 (7.8)
		3	—	0 (4.2)	0.06 (5.0)	—	0.19 (6.3)	0.20 (6.8)	0.13 (7.2)	—	0.09 (7.5)
		6	—	0 (4.2)	0.05 (5.0)	—	0.73 (6.3)	0.80 (6.8)	0.66 (7.2)	—	0.67 (7.5)
	C. + Cystein (1/20 Mol) 3 ccm	1	—	0	0 (5.0)	—	0 (6.0)	0.04 (6.5)	0 (7.0)	—	0 (8.0)
		3	—	0	0 (5.0)	—	0.11 (6.0)	0.21 (6.7)	0.16 (7.2)	—	0.16 (7.8)
		6	—	0	0 (5.6)	—	0.11 (6.0)	0.41 (6.7)	0.36 (7.2)	—	0.28 (8.0)
Gelatine	C. 3 ccm	5	0 (3.0)	0.06 (4.0)	0.07 (5.0)	0.09 (5.5)	0.12 (6.0)	0.27 (6.5)	0.29 (6.8)	0.32 (7.2)	0.31 (7,5)
		8	0 (3.0)	0.06 (4.0)	0.07 („)	0.13 („)	0.13 („)	0.35 („)	0.48 („)	0.43 („)	0.38 („)
		24	0 (3.0)	0.08 (4.0)	0.22 („)	0.32 („)	0.45 („)	0.70 („)	1.04 („)	0.78 (7.3)	0.62 (7.6)

Tabelle III.

Peptide-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens.

Subtrate (0.05 Mol-Lösung) 20 ccm	Mazerationssaft	Zeit Stunden	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 *n*-NaOH)								
			PH								
			6.0	6.5	7.0	7.5	7.7	8.0	8.5	9.0	9.7
Glycylglycin	C. 3 ccm	4	—	0.08 (6.5)	0.11 (7.0)	0.14 (7.4)	0.19 (7.7)	0.16 (8.0)	—	—	—
		8	—	0.15 („)	0.13 („)	0.23 (7.3)	0.25 (7.6)	0.19 (7.9)	—	—	—
		24	—	0.10 (6.4)	0.15 („)	0.26 (7.4)	0.30 (7.7)	0.26 (7.8)	—	—	—
	A, behandelt mit Kinasepulver (10 ccm + 0.1 g) 2 ccm	5	00.4 (6.0)	—	0 (7.0)	0.01 (7.0)	0.09 (7.7)	0.09 (8.0)*	0.06 (8.1)	0.16 (8.7)	−0.05 (9.3)
		24	0.04 („)	—	0.08 („)	0.11 („)	0.20 („)	0.15 („)	0.29 („)	0.53 („)	0.08 („)
		72	0.06 („)	—	0.19 („)	0.28 („)	0.65 (7.8)	0.54 („)	0.84 („)	0.99 („)	0.33 (8.9)
dl-Leucyglycin	C. 3 ccm	4	0.28 (6.2)	0.22 (6.4)	0.64 (7.0)	0.58 (7.5)	—	0.54 (8.0)	0.18 (8.5)	—	—
		8	0.51 („)	0.73 („)	0.60 („)	0.61 (7.4)	—	0.66 („)	0.25 („)	—	—
		24	0.56 („)	0.74 („)	0.64 („)	0.60 (7.5)	—	0.69 („)	0.27 (8.4)	—	—
	A, behandelt mit Kinasepulver (10 ccm + 0.1 g) 2 ccm	5	−0.04	—	0.04 (7.0)	—	—	0.20 (7.9)	0.29 (8.5)	0.33 (8.7)	0.05 (9.5)
		24	0.05	—	0.10 („)	—	—	0.62 (8.0)	0.69 („)	0.75 („)	0.39 („)
		72	0.07	—	0.30 („)	—	—	0.74 (8.0)	0.74 („)	0.77 („)	0.61 (9.1)
dl-Leucyldiglycin	C. 3 ccm	4	—	—	—	—	0.70 (7.7)	—	—	—	—
		8					0.77 („)				
		24					0.78 („)				

* Der Mazerationssaft B wurde gebraucht.

TABELLE IV.

Acylpeptide-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens.

Substrate (0.05 Mol-Lösung) 20 ccm	Mazerationssaft	Zeit Stunden	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 *n*-NaOH) PH 6.0	7.0	7.5	8.0	9.0
Benzoylglycin	B, aktiviert mit Kinasepulver (10 ccm + 0.1 g) 2 ccm	5	−0.02 (6.0)	0.02 (7.0)	0 (7.5)	0.01 (8.0)	0
		24	−0.04 („)	0 („)	0.01 („)	0.01 (7.8)	0
		72	−0.04 („)	0 („)	0.01 („)	0.01 (7.8)	0
	B, aktiviert mit Kinaselösung (1 : 1) 2 ccm	5	0	0	—	0	—
		24	−0.01	−0.02	—	0.01	—
		72	0.01	−0.02	—	0	
Benzoyldiglycin	B. 2 ccm	5	0.09 (6.0)	0 (7.0)	0.02 (7.5)	—	0.03 (8.6)
		24	0 („)	0 („)	0 („)	—	0.03 („)
		72	0 („)	0 („)	0 („)	—	0.03 („)
	B, aktiviert mit Kinasepulver (10 ccm + 0.1 g) 2 ccm	5	−0.05 (6.0)	0.02 (7.0)	—*	0.07 (7.4)	0.03 (8.6)
		24	−0.05 („)	0.02 („)	0.006 (7.5)	0.07 („)	0.03 („)
		72	−0.05 („)	0.02 („)	—	0.07 („)	0.03 („)
		144	—	—	0 (7.5)	—	—
	A, aktiviert mit Kinaselösung (1 : 1) 2 ccm	24	0.01 (6.0)	0.02 (7.0)	—	0.03 (7.7)	0.02 (8.6)
		72	0.03 („)	0.05 („)	—	0.02 (7.5)	0.01 („)
Benzoyl-*dl*-leucylglycin	A, aktiviert mit Kinaselösung (1 : 1) 4 ccm	24	—	—	0.057*	—	—
		72	—	—	0.100	—	—

* NH_3-N Zunahme (mg) in 1 ccm Digestionslösung.

Kinasepulver aktivierten Mazerationssaftes A) wurde besonders die NH_2-N Zunahme in 1 ccm Digestatlösung angegeben.

V. Halogenacylpeptide-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens. (Tabelle V)

Da bei den Versuchen mit Halogenacylderivaten die Möglichkeit der spontanen Halogenspaltung beobachtet wurde, wurde hier nur die NH_2-N Zunahme angegeben. Bei der Kontrolle wurde in der Bromisokapronyldiglycinlösung plus 30 Min. in siedendem Wasser erhitzter Enzymlösung keine Zunahme von NH_2-N festgestellt.

Tabelle V.

Halogenacylpeptide-Spaltung durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens.

Substrate (0.05 Mol-Lösung) 20 ccm	Mazerationssaft	NH_2N-Zunahme in 1 ccm Digestionslösung (mg NH_2N)		
		Zeit Stunden	PH 7.0	PH 7.5
dl-Bromisocapronylglycin	C. 3 ccm	5	0	0
		24	0	0
		72	0	0
dl-Bromisocapronyldiglycin	C. 3 ccm	5	0.004	—
		24	0.057	—
		72	0.103	—
Chloracetyl-*l*-phenylalanin	C. 3 ccm	5	—	0.611
		24	—	0.573
		72	—	0.620
Chloracetyl-*l*-tyrosin	A, aktiviert mit Kinaselösung (1 : 1) 4 ccm	24	—	0.145
		72	—	0.153
			—	
Chloracetyldiglycin	C. 6 ccm	5	—	0.007
		24	—	0.072
		72	—	0.083

VI. Die proteolytischen Wirkungen des Mazerationssaftes von Dünndarmschleimhaut des Kaninchens. (Tabelle VI)

Bei den Versuchen mit Bromisokapronylglycin bei P_H 7,2 ist

TABELLE VI.

Die proteolytischen Wirkungen des Mazerationssaftes von Dünndarmschleimhaut des Kaninchens.

Substratlösung 20 ccm	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 *n*-NaOH)									
	Zeit Stunden	PH								
		6.0	6.5	7.0	7.2	7.5	7.7	8.0	8.5	9.0
Casein (1%) 2 ccm Mazeration C	4	—	0.03	0.06	0.07	0.08	0.07	0.07	0.05	—
	8	—	0.09	0.15	0.17	0.15	0.15	0.15	0.14	—
	24	—	0.49	0.53	0.61	0.64	0.59	0.64	0.59	—
Gelatine (2%) 2 ccm Mazeration A	3	0.29	—	0.40	—	0.41	—	0.45	—	0.35
	8	0.69	—	1.07	—	1.10	—	1.13	—	1.00
	30	2.27	—	3.25	—	3.40	—	3.49	—	3.08
Glycylglycin (0.05 Mol.Lösung) 4 ccm Mazeration C	4	—	0.90	1.27	1.10	1.26	1.41	1.33	1.09	—
	8	—	1.26	1.47	1.26	1.38	1.47	1.44	1.26	—
	24	—	1.45	1.63	1.53	1.58	1.55	1.58	1.48	—
Glycylglycin (0.05 Mol-Lösung) 2 ccm Mazeration A	3	0.11	—	1.00	—	1.49	—	1.19	—	0.55
	8	0.30	—	1.56	—	1.47	—	1.39	—	0.72
	30	0.67	—	1.63	—	1.54	—	1.46	—	1.09
dl-Leucylglycin (0.05 Mol-Lösung) 2 ccm Mazeration C	4	0.17	0.67	0.59	—	0.44	—	0.27	—	—
	8	0.34	0.70	0.60	—	0.43	—	0.25	—	—
	24	0.76	0.68	0.59	—	0.46	—	0.27	—	—
dl-Leucylglycin (0.05 Mol-Lösung) 4 ccm Mazeration C	1	—	0.39	0.60	—	—	—	—	—	—
	2	—	0.70	0.74	-	—	—	—	—	—
	4	—	0.68	0.74	—	—	—	—	—	—
Benzoylglycin (0.05 Mol-Lösung) 4 ccm Mazeration C	5				0					
	24	—	—	—	−0.05	—	—	—	-	—
	72				−0.03					
Benzoyldiglycin (0.05 Mol-Lösung) 4 ccm Mazeration C	5				0					
	24	—	—	—	−0.02	—	—	—	—	—
	72				−0.01					
Chloracetyl-l-phenylalanin (0.05 Mol-Lösung) 4 ccm Mazeration C	5				0.033*					
	24	—	—	—	0.059	—	—	—	—	-
	72				0.093					
Chloracetylglycylglycin (0.05 Mol-Lösung) 4 ccm Mazeration C	5				0.006*					
	24	—	—	—	0.051	—	—	—	—	—
	72				0.053					
Bromisocapronylglycin (0.05 MolL-sung) 4 ccm Mazeration C	5				0*					
	24	—	—	—	0.001	—	—	—	—	—
	72				0.002					

* NH_2-N Zunahme (mg) in 1 ccm Digestionslösung.

die NH_2-N Zunahme (mg.) in 1 ccm Digestatlösung angegeben. Hier sind zwei Fälle von Dipeptidspaltung durch den Mazerationssaft A und C unter Berücksichtigung der Mediumsreaktion angeführt.

Zusammenfassung.

1. Im Mazerationssaft der Pankreasdrüse des Kaninchens wurde aktive Trypsinwirkung (P_H 7,0–8,0) festgestellt. Bei schwach saurer Reaktion (gegen 5,5–6,0) fand sich noch deutlich proteolytische Wirkung.

2. Ausserdem zeigte der Mazerationssaft von Kaninchenpankreas Peptidasewirkung (P_H 7,0–8,0), wahrscheinlich rührt diese von der Gewebspeptidase her.

3. Histozymwirkung des Mazerationssaftes ist ausgeschlossen. Die Chloracetylaminosäuren werden durch den Mazerationssaft angegriffen, Benzoyl- und Bromisokapronylglycin dagegen nicht. Benzoylleucylglycin und Bromisokapronyldiglycin werden durch den Mazeratiossaft hydrolysiert.

4. Im Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens wurden Trypsin sowie Erepsinwirkung (P_H 7,0–8,0) festgestellt.

5. Benzoylglycin, Benzoyldiglycin und auch Bromisokapronylglycin wurden durch den Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut nicht gespalten.

LITERATUR.

Abderhalden, E. u. Schmitz, A. (1929): Fermentforschung, **10**, 591.
Abderhalden, E. u. Zeisset, W. (1930): Fermentf., **11**, 183.
Abderhalden, E. u. Herrmann, O. (1929): Fermentf., **10**, 474.
Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1929): Fermentf., **10**, 478.
Abderhalden, E. u. Zeisset, W. (1929): Fermentf., **10**, 481.
Grassmann, W., Dyckerhoff, H. u. Schoenebeck, O. v. (1930): Z. f. physiol. Chem., **186**, 183.
Grassmann, W., Schoenebeck, O. v. u. Eibeler, H. (1933): Z. f. physiol. Chem., **194**, 124.
Utzino, S. (1928): J. of Biochem., **9**, 483.
Waldschmidt-Leitz, E. (1930): Naturw., **18**, 280.

Waldschmidt-Leitz, E. u. Schäffner, A. (1933): Z. f. physiol. Chem., **214**, 75.

Waldschmidt-Leitz, E., Klein, W. u. Schäffner, A. (1928): Ber. chem. Ges., **61**, 2092.

Waldschmidt-Leitz, E. u. Purr, A. (1929): Ber. chem. Ges., **62**, 2217.

Waldschmidt-Leitz, E. u. Shinoda, O. (1928): Z. f. physiol. Chem., **176**, 301.

Willstätter, R. (1928): Untersuchungen über Enzyme.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

UMSATZ DER FETTSTOFFE IN DEN NERVENGEWEBEN DER TAUBE BEI DER B-AVITAMINOSE.

Von

YASUWO TAKATA.

(*Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Akademie Kumamoto, Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.*)

(Eingegangen am 23. Juli 1936)

Einleitung:

Es ist bekannt, dass sich bei den Vögeln infolge der Reiskrankheit (B-Avitaminose) das Nervensystem entzündet, und es sind nun die histologischen Veränderungen der Nervengewebe in diesem Fall ausführlich untersucht worden. Nakamoto(1925) hat durch Fütterung von poliertem Reis mit Zusatz einer geringen Menge von Lanolin, Eigelb, Rückstand von Bohnengallerte und Calciumsalzen bei Tauben die Reiskrankheit (B-Avitaminose) hervorgerufen und dabei festgestellt, dass sich an der motorischen Peripherienervenfaser der Schenkelmuskel die Markscheide brach und der Degeneration verfiel und auch der Achsenzylinder im allgemeinen anschwoll und degenerierte. Ferner berichteten Nakamoto und Kasahara (1927), dass die Hauptsymtome bei der Reiskrankheit (B-Avitaminose) der Taube die Schwellung und die Degeneration der Bestandteile der im Herzen verzweigten Nervenachsenzylinder, besonders der Nervenendigung seien. Ito (1926) beobachtete an der mit poliertem Reis und Wasser gefütterten Ente den Nervus ischiadicus. Durch die Marky's-Färbungsmethode traten an verschiedenen Stellen der Nervenfaser osmiumgefärbte Substanzen in Erscheinung und in der Markscheide waren viele kleine osmiumgefärbte Granula, d. h. Elsholz'sche Körnchen, vorhanden; die Ursache davon war die fettige Degeneration; beim Fortschreiten der Degeneration brach und zerriss die Markscheide, der Achsenzylinder verlor seine Form, schwoll an, verzweigte sich und schliesslich verschwand die Faser ganz. Kura und Kasahara (1928) riefen durch Füttern von poliertem Reis und Wasser die

Reiskrankheit (B-Avitaminose) bei der Taube hervor und beobachteten genau die Veränderungen der sympathischen Nervenfaser des Muskulus arrector pili und deren Nervenendigung und erklärten, dass das Hauptsymtom der Degeneration beim Achsenzylinder die Schwellung war. Ferner berichteten Kura und Mizuno (1928) von der Degeneration der Nervenfaser der Rindensubstanz, nämlich einer Schwellung des Achsenzylinderfortsatzes des Kleinhirns bei der mit poliertem Reis und Wasser gefütterten Taube, die von der Reiskrankheit (B-Avitaminose) befallen war. Sato (1933) teilte mit, dass bei Hühnern durch Fütterung von poliertem Reispulver, Asche von Kleien und Wasser und beim Kaninchen von poliertem Reispulver und Reisstroh die Reiskrankheit (B-Avitaminose) hervorgerufen war, die Ganglien der Rückenmarksnerven in Atrophie verfielen.

Die pathologisch-histologischen Veränderungen der Zentral- und Peripherienerven bei der Reiskrankheit (B-Avitaminose) wurde, wie oben erwähnt, von vielen Autoren genau beobachtet. Was aber die Beobachtung der Fettstoffe betrifft, so habe ich ausser den Erörterungen des oben genannten Ito keine andere Berichte in der Literatur gefunden.

Es ist seit Thudichum (1901) schon lange bekannt, dass in den Nervengeweben die Fettstoffe reich vorhanden sind; diese sind Lecithin, Kephalin, Sphingomyelin, Cholesterin und Cerebroside. Nach obigem steht es fest, dass bei den Vögeln infolge der Reiskrankheit eine Veränderung der Nervengewebe entsteht und daraus ergibt sich die Folgerung, dass selbstverständlich auch in den Bestandteilen der Gewebe besonders den Fettstoffen, die in den Nervengeweben reich enthalten sind, sich Veränderungen zeigen müssten.

Hier führe ich nun die Literatur an, die über die biochemische Untersuchung der Beziehungen der Fettstoffe zur B-Avitaminose berichtet. Nach Naito (1923) erleidet das Lecithin im Gehirn der Avitaminosen Ratte keine Veränderung oder nur eine geringe Abnahme, und auch das Kephalin bleibt unverändert. Nach Hotta (1923) zeigen die Phosphatide im Hirn der Reistaube keine Veränderungen oder eine Abnahme, das Cholesterin eine Zunahme.

Gassner (1927) untersuchte die Veränderung der Cholesterinmenge in dem Gehirn, Rückenmark und den Flügelnerven bei der Reistaube und berichtete von einer Zunahme der freien Cholesterinmenge verglichen mit der Normaltaube. Das gebundene Cholesterin zeigte nach ihm in den Flügelnerven Neigung zur Zunahme, doch erleidet die Menge im Gehirn und Rückenmark keine Veränderung. Schmitz (1928) beobachtete, dass die Phosphatide im Blute bei der B-Avitaminose abnahm, und dachte, dass es durch Gleichgewichtsstörung des Umsatzes infolge der Entkräftung der Synthese der für das Gehirn wichtigen Substanz hervorgerufen wurde. Er konnte hierauf durch Zufügung irgendeiner Menge Phosphatide den Laufe der Krankheit der Taube aufhalten, doch die Krankheit nicht heilen lassen.

Aber man sieht aus den obigen Berichten, dass die Reiskrankheit (B-Avitaminose) nur durch die Fütterung von poliertem Reis entsteht. Durch Fujimaki (1928) wurde bekannt, dass beim Schälen mit Sand das Vitamin B_1 des Reises gänzlich verloren geht, während beim Schälen ohne Sand eine geringe Menge übrig bleibt. Doch behauptet Axtmayer (1930), dass im polierten Reis weder B_1- noch B_2- Vitamin enthalten sei. Im polierten Reis sind also die Vitamine B_1 und B_2 überhaupt nicht oder kaum vorhanden. Daher fehlen den mit poliertem Reis gefütterten Tieren nicht nur das Vitamin B_1, d. h. das antineuritische Vitamin, sondern auch B_2 und die Beziehungen der durch die Reisfütterung entstehenden Krankheit, d. h. Reiskrankheit (B-Avitaminose) zu diesen Vitamine sind unklar.

Hier habe ich nun dem politerten Reis eine genügende Menge Eiweiss und anorganische Salze sowie die Vitamin A und C beigefügt und rief so B-Avitaminose hervor. Also rief ich reine B-Avitaminose hervor und schied diese gänzlich von der Reiskrankheit, dann beobachtete ich den von Vitamin B_1 und B_2 auf den Fettstoffumsatz ausgeübten Einfluss.

Nächstdem, um die Veränderungen der Fettstoffe der Nervengewebe der Versuchstiere untersuchen zu können, war es wichtig, festzustellen, welche Fettstoffe im polierten Reis enthalten sind und wie diese in den Körper der Taube aufgenommen werden. Es ist

bekannt, dass Lysolecithin auf die Erythrozyten eine Hämolyse erweckt. Durch Belfanti (1924) wurde klar, dass das Lysolecithin im Pankreas und in den Speicheldrüsen enthalten ist. Iwata (1930) zog eine grosse Menge Lysolecithin aus dem polierten Reis. Bis jetzt wurde bezüglich der Fettstoffe des polierten Reises nur von dem Fett des Ätherextraktes in demselben berichtet {Saiki (1931)}, während es keine Literatur gab, die von Gesamtfettsäure, Cholesterin, Lecithin und Kephalin berichtete. Da im polierten Reis Lysolecithin enthalten ist, nimmt man an, dass auch Lecithin vorhanden ist, und man könnte als selbstverständlich annehmen, dass, weil in den tierischen Geweben Lecithin und Kephalin fast immer vorhanden sind, ausser dem Lecithin auch Kephalin im polierten Reis vorhanden sein muss. Hier habe ich diese Probleme in Angriff genommen und die Beziehungen zwischen der Reiskrankheit oder B-Avitaminose und dem Umsatz der Fettstoffe der Nervengewebe der Vögel gründlich untersucht.

Eigentlich stehen die Fettstoffe durch ihre Fettsäure und ihre anderen Bausteine mitteinander in inniger Beziehung und Degkwitz (1931) erklärt diese sehr gut. Man kann sich vorstellen, dass, wenn bei der B_1 B_2 und B_1-Avitaminosefütterung sich ein abnormaler Umsatz eines der Fettstoffe der Nervengewebe der Taube zeigt, hierauf auch das Gleichgewicht des Umsatzes der anderen gestört wird; doch ist bis jetzt bei den Untersuchungen des Fettstoffumsatzes diesem Punkte gar keine Beachtung geschenkt worden.

Um die Beziehung zwischen den Fettstoffen der Nervengewebe und den Vitaminen B_1 and B_2 zu klären, habe ich bei der mit der B_1 B_2-avitaminotischen Nahrung gefütterten, sowie ferner bei der mit der B_1-avitaminotischen gefütterten Taube die Zu- und Abnahme einzelner Fettstoffe im Nervensystem beobachtet.

Weil die Tiere bei der Reiskrankheit (B-Avitaminose) infolge Appetitlosigkeit hungerten und ihr Körpergewicht abnahm, habe ich ferner bei den ins Hungern verfallenden Tieren den Umsatz der Fettstoffe beobachtet.

Experiment.

I. Fettstoffe des Reises.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, muss man wissen, welche Fettstoffe in dem polierten Reis enthalten sind, um zu erklären, ob Beziehungen zwischen den Fettstoffen der Nervengewebe und des polierten Reises bei der Reiskrankheit (B-Avitaminose) vorhanden sind oder nicht.

Als Experimentmaterial wurde der beste in der Stadt verkaufte Reis verwendet (Asahigo, 10 Monate nach der Ernte), mit Wasser gewaschen, und nachdem er getrocknet war, in der Mühle zu Pulver gemahlen. Dies wurde in einem 5 qmm-Sieb gesiebt und der gesiebte Teil als poliertes Reispulver benutzt.

A. Die Gesamtfettsäure- und Gesamtcholesterinmenge im polierten Reis.

Bis jetzt ist als Fettstoff im polierten Reis nur der Ätherextrakt des polierten Reises angegeben worden, doch war es nicht bekannt, was für ein Fettstoff im Ätherextrakt enthalten ist.

Extraktion der Fettstoffe: 500 g poliertes Reispulver wurde 24 Stunden in 700 ccm Äther extrahiert, Ätherextrakt filtriert, der Rückstand wieder in Äther extrahiert und filtriert. Extraktion wurde noch weiter dreimal wiederholt, der ganze Ätherextrakt zusammengemischt, dann in Vakuum konzentriert, in einen Becher umgefüllt, der Äther bei niederer Temperatur verdampft und bei 50° getrocknet. Darauf wurde im Exsiccator auf Calciumchlorid abgekühlt und gewogen. Aus 500 g poliertem Reispulver gewann man etwa 1,1–1,3 g Extrakt.

Gesamtfettsäuremenge: Das Ätherextrakt des polierten Reises wurde nach Kumagawa- und Suto'scher Methode (1908) bestimmt. Aus 500 g poliertem Reispulver ergab sich 1,2 g Gesamtfettsäure.

Gesamtcholesterinmenge: Aus dem Ätherextrakt des polierten Reises bestimmte man das Gesamtcholesterin nach Osato und Heki (1930). Aus 500 g poliertem Reispulver erhielt man 15 mg Gesamtcholesterin.

B. Lecithin und Kephalin im polierten Reis.

Nach der Levene'schen Methode (1924) die das Lecithin von der Bohne trennte, wollte ich das Lecithin nachweisen. Aus 1 kg Reispulver konnte man aber weder Stickstoff noch Phosphor von Lipoidnatur feststellen.

Ferner wollte ich nach Sueyoshi (1931) das Lecithin im polierten Reis nachweisen.

Hierauf konzentrierte man den Ätherextrakt des 1 kg polierten Reises und fällte diesen mit Aceton. Der Niederschlag wurde in Äther aufgelöst, mit Aceton gefällt, diese Behandlung wurde wiederholt, bis Aceton keine Färbung zeigte. Der Fällung gab man Reinalkohol bei, und der Alkohollösung wurde $CdCl_2$-Reinalkohollösung beigfügt und eine Fällung gemacht. Diese wurde durch Zentrifugiererung entfernt, einmal mit reinem Alkohol gewaschen und im Exsiccator im Vakuum getrocknet, dann wurde Äther beigegeben. Ein ätherlöslichr Teil (Kephalin-Cadmiumsalz) war gar nicht vorhanden, hierauf wurde der ätherunlösliche Teil noch einmal im Exsiccator im Vakuum getrocknet. Von dieser getrockneten Substanz gab man eine kleinen Menge in ein Spitzglas, fügte ein wenig 60–80% Alkohol hinzu, erhitzte es bis auf 60–80°C und liess es auflösen. Hierauf liess man es ruhig an einem kühlen Ort stehen, goss die obere klare Flüssigkeit ab, brachte ein wenig von der Fällung auf ein Objektglas, deckte es mit dem Deckglas zu und stellte mikroskopisch keine Kristalle fest, und in dieser Substanz konnte man weder Stickstoff noch Phosphor nachweisen.

Lecithin und Kephalin in der Reiskleie: Nach der oben erwähnten Levene- und Rolf'schen Methode wollte ich das Lecithin und Kephailn aus der Reiskleie trennen. Zuerst wurde der Ätherextrakt der 500 g Reiskleie mit Aceton gefällt und man erhielt eine weisse, nicht klebrige Substanz, welche weder Phosphor noch Stickstoff enthielt. Hierauf fällte man den heissen Reinalkoholextrakt der Reiskleie mit $CdCl_2$, behandelte ihn ferner mit ammoniumhaltigem Alkohol, liess das Filtrat verdampfen und trocknen. Auch in dieser Substanz konnte weder Phosphor noch Stickstoff nachgewiesen werden.

Lecithin und Kephalin im frischen polierten Reis: Man schnitt

reifen Reis vom Reisfeld, nahm nur die Reishülle und machte sofort mit der Reisschälmaschine daraus polierten Reis, der in einem Mörser pulverisiert wurde. Im so gewonnenen 1 kg Reispulver konnte ich durch dieselbe Methode wie die oben erwähnte bei altem Reis, weder Lecithin noch Kephalin nachweisen.

Aus meinen Versuchen wurde klar, dass in dem reifen Reis weder Lecithin noch Kephalin enthalten ist. Daher nehmen die Tiere bei der Fütterung dieses Reispulvers das Lecithin und Kephalin, die beide für die Gewebe der Tiere so wichtige Bestandteile sind, nicht auf, und deswegen ist der Umsatz der Fettstoffe im Körper in diesem Fall wohl noch ein interessierendes Problem.

II. Über die Bestimmung der Gewebefettstoffe.

Wenn bei dem Studium des Fettumsatzes nur ganz kleine Mengen des Materials für die Bestimmung der Gewebefettstoffe geliefert wird, ist es natürlich, dass die Bestimmungsmethode grossen Einfluss ausübt. Also habe ich von den bisherigen Bestimmungsmethoden diejenigen gewählt, die am geeignetsten schienen, diese bis ins kleinste ausprobiert und dann verbessert. Ich gebe unten die Ergebnisse bekannt.

1. *Die Extraktion der Gewebefettstoffe.*

Bei der Bestimmung der Gewebefettstoffe spielt die Extraktion der Fettstoffe eine wichtige Rolle. Die Methode von Kumagawa-Suto (1908) ermöglicht im allgemeinen eine vollkommene Extraktion aus dem Gewebe; aber bei Verwendung von kleinen Mengen ist sie unpraktisch. Osato und Heki (1928) liessen das Gewebe gefrieren, zersetzen und zermalmten es durch Reibung mit Glassplittern und extrahierten die Fettstoffe durch Alkohol-Äther-Mischung. Endo (1928) prüfte diese Methode nach, und verwandte an Stelle von Vereisung Schmirgel und zerrieb mit kleiner Menge von Alkohol. Er prüfte weiter das Verhältnis von reinem Alkohol und Äther, um aus dem gemahlenen Brei alle Fettkörper auf einmal zu lösen, und kam zu dem Ergebnis, dass die Mischung der beiden Flüssigkeiten in gleicher Dosis am geeignetsten zur Extraktion sei. Ich dachte, dass die Methode Osato-Heki und

die Endo'sche Methode am geeignet seien, um eine kleine Menge der Fettstoffe im natürlichen Zustand zu extrahieren und prüfte dieselben nach. Beide Methoden stimmen in ihren Ergebnissen überein, aber bei der Zerreibung nach Osato-Heki besteht die Gefahr, dass Glassplitter abspringen, und die Behandlung selbst ist umständlicher als die der Endo'schen Methode. Ich gebrauchte deshalb die Endo'sche Methode.

Man nimmt 0,2–0,5 g frischen, rohen Materials auf ein Deckglas (22 × 32 mm) in einem flachen Wägeglas und wiegt, gibt es sodann samt dem Deckglas in einen Porzelanmörser und zerreibt es mit der 5 fachen Quantität Schmirgel. Darauf fügt man 2 ccm reinen Alkohol hinzu und zerreibt, dann fügt man 4 ccm Alkohol-Äther-Mischung hinzu, reibt noch einmal eine Weile, und füllt dann das Ganze durch einen kleinen Trichter in einen 100 ccm fassenden Meyerkolben. Darauf spült man den Mörser mit je 4 ccm Alkohol-Äther 5 mal und tut auch dies in den Meyerkolben. Man lässt den Kolbeninhalt 30 Sekunden auf Wasserbad von 60–70°C kochen, kühlt bei Zimmertemperatur ab und filtriert die Flüssigkeit in einen 50 ccm fassenden Messkolben ab, spült den Kolben 4 mal mit je 4 ccm Alkohol-Äther-Mischung und fügt Alkohol-Äther-Mischung bis zu 50 ccm hinzu.

2. *Bestimmung der Gesamtfettsäure.*

Die Methode von Kumagawa und Suto (1908) ist nur bei grossen Mengen verwendbar und deshalb für kleinere Mengen unbrauchbar; es gibt verschiedene Bestimmungsmethoden für kleine Mengen. In den meisten Fällen wurde die Oxydationsmethode verwandt. Da es aber ziemlich einfach ist, ungefähr 2 mg Gewebefett mit der Wage abzuwiegen, extrahierte ich vorerst wie oben die Fettstoffe, verseifte den Extrakt durch Natronlauge, machte die Fettsäure durch Säure frei und extrahierte daraus wiederum die Fettsäure durch den Kumagawa-Suto'schen Flüssigkeit-Extraktionsapparat.

Zunächst versuchte ich es mit Palmitinsäure (Merck-Präparat): Die Palmitinsäure wurde mit Natronlauge verseift, der Seifelösung Salzsäure beigefügt und die Fettsäure frei gemacht,

sie wurde mit Äther und dann mit Petroläther extrahiert. Die durch Petroläther extrahierte Flüssigkeit goss ich in einen Becher und liess Petroläther verdampfen. Es besteht aber die Gefahr, dass der Petrolätherextrakt mit dem Petroläther zusammen über den Rand des Bechers verloren geht, deshalb schliff ich den Rand des Bechers, von 20 ccm Inhalt.

Bei der Extraktion der Fettsäure mit Äther überlegte ich, ob ich den Scheidetrichter oder den Flüssigkeitsextraktor verwenden sollte, um es möglichst einfach, ökonomisch und genau zu machen.

Wenn man den Scheidetrichter anwenden will, muss man vorsichtig sein, dass Hahnfett durch den Äther aufgelöst wird. Ich verschloss daher den Hahn anstatt mit Fett mit Destillationswasser, wodurch ich ein gutes Ergebnis erzielte. (Tabelle I)

Tabelle I.

Versuch	Gesamtfettsäure		
	Theoretisch. mg	Gefunden	
		mg	%
1	4,0	3,860	97,0
2	4,0	3,995	99,9
3	2,0	2,045	102,0

Darauf extrahierte ich anstatt mit einem Scheidetrichter mit dem Mikroflüssigkeitsextraktor im Laufe von drei Stunden die Fettsäure, und das Ergebnis war, wie Tabelle II zeigt bei 4 mg Fettsäure 99%, bei 2 mg 105%.

Tabelle II.

Versuch	Fettsäure		
	Theoretisch. mg	Gefunden	
		mg	%
1	4,0	3,96	99,0
2	2,0	2,10	105,0

Man kann, wie Tabelle I und II zeigen, entweder den Scheidetrichter oder den Flüssigkeitsextraktor verwenden. Wenn man aber den Flüssigkeitsextraktor verwendet, dauert die Extraktion sehr lange, dagegen braucht man weniger Äther als bei Anwendung des Scheidetrichters. Ich verwandte zur Bestimmung des Gewebefetts den Flüssigkeitsextraktor.

Demnächst bestimmte ich die Fettsäure des Huhn-Hirns. Um die Menge der Natronlauge zu bestimmen, welche benötigt ist, 20 ccm von 100 ccm Extrakt aus 1 g Material zu verseifen, versuchte ich Verseifung mit 5 ccm und 6 ccm 20%iger Natronlauge und erzielte ganz dasselbe Ergebniss.

Die Bestimmungsmethode der Gesamtfettsäure ist also wie folgt: 20 ccm Alkohol-Äther-Extrakt gibt man in einen 100 ccm fassenden Meyerkolben und lässt diesen auf einem Wasserbad solange verdampfen, bis der Äthergeruch verschwindet. Dazu fügt man 5 ccm 20%ige Natronlauge und erhitzt, bis kein Alkoholgeruch mehr wahrnehmbar ist, fügt darauf 5 ccm Wasser hinzu und erhitzt das Ganze wiederum. Nach Beendigung der Verseifung füllt man die noch heisse Flüssigkeit in den Flüssigkeitsextraktor. Den Kolben spült man mit heissem Wasser und füllt dieses Spülungswasser auch in den Flüssigkeitsextraktor. Darauf säuert man den Inhalt des Extraktors mit reiner Salzsäure, macht die Fettsäure frei, wartet ab, bis die Flüssigkeit sich abkühlt und extrahiert dann mit Äther drei Stunden. Man lässt den Äther verdampfen, extrahiert den Rückstand mit reinem Äther, filtriert den Extrakt durch einen Asbestfilter in den 50 ccm fassenden Meyerkolben. Nachdem der Äther verdampft ist, trocknet man das Ganze bei 50°C eine Stunde, und während es noch warm ist, füllt man die noch heisse Flüssigkeit in den Flüssigkeitsextraktor. mit einem Korken und lässt es eine Stunde lang bei Zimmertemperatur stehen. Darauf filtriert man die Flüssigkeit abermals durch einen Asbestfilter in einen bis zum konstanten Gewicht getrockneten 30 ccm fassenden, verschliffenen Becher. Den Petroläther lässt man langsam verdampfen und lässt den Rückstand bei 50°C in einem Trockenschrank bis zu seinem konstanten Gewicht trocknen.

3. *Bestimmung von Cholesterin.*

Es gelang Osato und Heki (1930), die Digitoninmethode für Cholesterinbestimmung im Falle sehr kleiner Mengen gelten zu lassen. Die Extraktionflüssigkeit aus dem Gewebe wurde verdampft, durch Aceton extrahiert, ein wenig Wasser hinzugefügt, und nachdem das Ganze auf 50–60°C erwärmt wurde, 0,5–1,5 ccm Digitonin-Alkohollösung zugefügt und ein vollkommener Niederschlag des Digitonids erzielt, es wurde weiter festgestellt, dass andere Arten von Fettstoffen einen vollkommenen Niederschlag des Digitonincholesterids nicht beeinflussen.

Ich verwandte zur Bestimmung des Cholesterins des Gewebes die Osato und Heki'sche Methode, und zur Filtrierung des Digitonids benützte ich einen Filter aus Jenaglas (10 G, 3) von den Zeiss-Werken.

Bildung eines Niederschlages von Cholesterindigitonid und dessen Verhältnis zur Wärme und die Spüllungsweise: Osato und Heki (1930) empfehlen zur Bildung eines Niederschlages des Digitonids 50–60°C und zur Spülung desselben zuerst Aceton und dann Äther. Ich habe den nötigen Wärmegrad zur Bildung eines Niederschlages, die Zeitdauer der Erwärmung, sowie die Menge des zur Spülung von überflüssigem Digitonin benötigten Acetons und Äthers ausführlich studiert.

Tabelle III.

Versuch	Cholesterin-Menge (Theoretisch.) mg	t°	Zeitdauer Min.	Die zur Spülung des Niederschlags gebrauchte Menge des Acetons u. Äthers ist je 20 ccm	Menge der Nieder-schl.	Cholesterin-Menge (Gefunden)	
						mg	%
1	1,39	60	5		5.61	1,36	98
2	„	50	„		5,66	1,38	99

Wie Tabelle III zeigt, kann der Wärmegrad zwischen 50–60°C sein; aber bei 60 Grad verdampft das Aceton, und manchmal läuft es über. Deshalb ist zu empfehlen die Temperatur auf 50°C und die Zeitdauer auf 5 Min. zu halten.

Wie Tabelle IV zeigt, genügen je 10 ccm Aceton und Äther,

Tabelle IV.

Versuch	Cholesterin-Menge (Theoretisch.) mg	Die zur Spülung des Niederschlags benötigte Aceton- und Äther-Menge ccm	Niederschlags-menge mg	Cholesterin-Menge (Gefunden)	
				mg	%
1	1,39	je 10	5,75	1,40	101
2	„	„	5,90	1,44	103
3	„	„	6,00	1,46	106
4	„	je 20	5,66	1,38	99
5	„	„	5,61	1,36	98
6	„	„	5,66	1,38	99

um ungefähr 6 mg Niederschlag von Cholesterindigitonid zu spülen.

Die Bestimmung von Gesamtcholesterin aus dem Gewebe: Osato und Heki kochten 3 mg Cholesterin in einer 2%igen Natriumalkoholatlösung von 2 ccm während 2 Stunden und konnten dadurch das Cholesterinester vollkommen verseifen. Auch ich habe gleich ihnen, um den Extrakt aus dem Gewebe zu verseifen, in 2 ccm 2%iger Natriumalkoholatlösung 2 Stunden kochen lassen. Dann extrahierte ich während 3 Stunden mit dem Mikroflüssigkeitsextraktor durch Äther, spülte die Extraktionsflüssigkeit mit wenig Wasser, sammelte die Ätherschicht in einen Becher und liess den Äther verdampfen. Aber ich befürchtete, dass, wenn man den Ätherextrakt mit Wasser spült, durch diese Spülung etwas von dem Cholesterin verloren gehen könne, weshalb ich die Beziehung der Spülungswassermenge zur Cholesterinmenge untersuchte.

Ich löste das gereinigte Cholesterin in angewärmtem Alkohol auf, goss 2%ige Natriumalkoholatlösung hinzu, liess 2 Stunden kochen und dann abkühlen. Darauf bestimmte ich die Menge von Cholesterin, das, nachdem es während drei Stunden mit dem Flüssigkeitsextraktor extrahiert wurde, mit Wasser von verschiedener Menge gespült wurde, und die Menge von solchem Cholesterin, das nach der Extraktion nicht mit Wasser behandelt worden war.

Wie Tabelle V zeigt, geht ein gewisser Teil von Cholesterin bei der Wasserspülung der Extraktionsflüssigkeit in das Wasser über.

Tabelle V.

Versuch	Cholesterin-Menge (Theoretisch.) mg	Die zur Spülung des Niederschlags gebrauchte Wassermenge ccm	Niederschlags-menge mg	Cholesterin-Menge (Gefunden)	
				mg	%
1	1,39	einmal mit 3 ccm 2-mal mit 1 ccm	5.05	1,23	88,4
2	„	2-mal mit 1 ccm	5,30	1,29	92,8
3	„	einmal mit 3 ccm	5,55	1,35	97,0
4	„	„ „ „	5,40	1,31	94,6
5	„	nicht spülen	5,60	1,36	98,0
6	„	„ „	5,80	1,41	102,0
7	1,22	„ „	5,00	1,22	100,0
8	„	„ „	5,05	1,23	101,0

Deshalb rate ich, die Extraktionsflüssigkeit ohne Spülung mit Wasser in einen Becher zu geben; Äther wurde verdampft, danach wurde der Rückstand in Aceton aufgelöst.

Als nächstes untersuchte ich, wieviel Aceton oder Äther man benötigt, um das bei der Bildung eines Niederschlages ihm anhaftende Digitonin und die unbekannten unverseifbaren Substanzen zu entfernen.

Tabelle VI.

Material	Versuch	Die zur Spülung des Niederschlags benötigte Aceton- und Äthermenge ccm	Nieder-schlags-menge mg	Gesamtcholesterin-Menge	
				mg	%
50 ccm Ext. aus dem 0,5 g Huhn-Gehirn, davon gebraucht je 10 ccm	1	je 10	7,15	1,74	1,74
	2	je 20	7,10	1,73	1,73
	3	je 30	6,80	1,65	1,65

In Tabelle VI kommt zum Ausdruck, dass je 10 ccm Aceton und Äther, zur Spülung des Niederschlags von Digitonincholesterid benötigt werden.

Die Methode der Bestimmung des Gewebe-Gesamtcholesterins

ist also wie folgt: Man gibt 10 ccm Alkohol-Äther-Extraktionsflüssigkeit in einen 50 ccm fassenden Meyerkolben, lässt Alkohol und Äther verdampfen. Den Rückstand wärmt man mit 10 ccm reinem Alkohol und löst auf. Darauf gibt man dazu 2 ccm 2%ige Natriumalkoholatlösung und lässt das Ganze 2 Stunden lang klein kochen. Nachdem sie in der Zimmertemperatur abgekühlt ist, füllt man vorsichtig die Flüssigkeit in den Mikroflüssigkeitsextraktor, spült den Kolben dreimal mit je 2 ccm Äther, 5 mal mit Wasser und füllt auch diese Flüssigkeit in den Extraktor. Mit der in den Extraktor gestellten Glasröhre vermengt man die Flüssigkeit gründlich und extrahiert dann mit Äther 3 Stunden lang. Die Extraktionsflüssigkeit giesst man in einen 50 ccm fassenden Becher und lässt den Äther verdampfen. Den Rückstand löst man mit 2 ccm reinem Aceton und filtriert die Flüssigkeit durch einen mit Watte verstopften kleinen Trichter in ein 30 ccm fassendes Zentrifugiergefäss. Den Becher spült man 3 mal mit je 2 ccm Aceton und filtriert auch diese Flüssigkeit durch den Trichter in das Zentrifugiergefäss. Auf diese Weise wird das durch Aceton aufgelöste Cholesterin vollkommen extrahiert und kann dann in das Zentrifugiergefäss umgefüllt werden. Man dampft den Acetonextrakt bis auf 8 ccm ab, fügt dazu 2 ccm destilliertes Wasser. Die zu untersuchende Flüssigkeit und 1%ige Digitoninalkohollösung wärmt man während 5 Min. auf Wasserbad von 50°C, und nachdem sich die Flüssigkeiten vereinigt haben, schüttelt man sie 1–2 Min. lang. Die Flüssigkeit wird bei Zimmertemperatur stehen glassen und nach einer Stunde filtriert. Zur Filtrierung verwendet man einen Jenaglasfilter (10 G, 3) der Zeiss-Werke. Diesen Filter wäscht man vorher gut mit Seife, spült gründlich mit Wasser, Aceton und Äther und lässt ihn bei 100°C in einem Trockenschrank bis zum Konstanzgewicht trocknen. Wenn man die Flüssigkeit filtriert, spült man darauf den Niederschlag mit 10 ccm reinem Aceton und dann 10 ccm reinem Äther, lässt ihn bei 100°C bis zur Konstanz trocknen. Das Trocknen erfolgt während 1 Stunde, das Abkühlen im Exsiccator erfordert ebenfalls 1 Stunde. Die Cholesterinmenge ergibt sich, indem man den Niederschlag durch 4,11 dividiert.

Die Bestimmung von Freicholesterin aus dem Gewebe: Man nimmt ein bestimmte Menge von Alkohol-Äther-Extrakt aus dem Gewebe, verdampft die Flüssigkeiten und trocknet, löst darauf in reinem Aceton auf, filtriert in ein 30 ccm fassendes Zentrifugiergefäss. Man bereitet 8 ccm filtrierte Flüssigkeit, fügt 2 ccm Wasser dazu, wärmt die Flüssigkeit an und fügt dazu Digitonin-Alkohol-Lösung. So entsteht Digitonincholesterid. Die Filtrierung des Niederschlages sowie die weitere Behandlung verlaufen genau wie bei der oben erwähnten Bestimmung von Gesamtcholesterin.

Die Menge von Freicholesterin im 0,1 g Hirn des Huhns ist nach Tabelle VII, 1,14–1,18 mg.

Tabelle VII.

Material	Versuch	Niederschlags-menge mg	Cholesterin-Menge	
			mg	%
100 ccm Extrakt aus dem 1 g Huhn-Gehirn, davon gebraucht je 10 ccm	1	4,70	1,14	1,14
	2	4,75	1,16	1,16
	3	4,70	1,14	1,14
	4	4,85	1,18	1,18

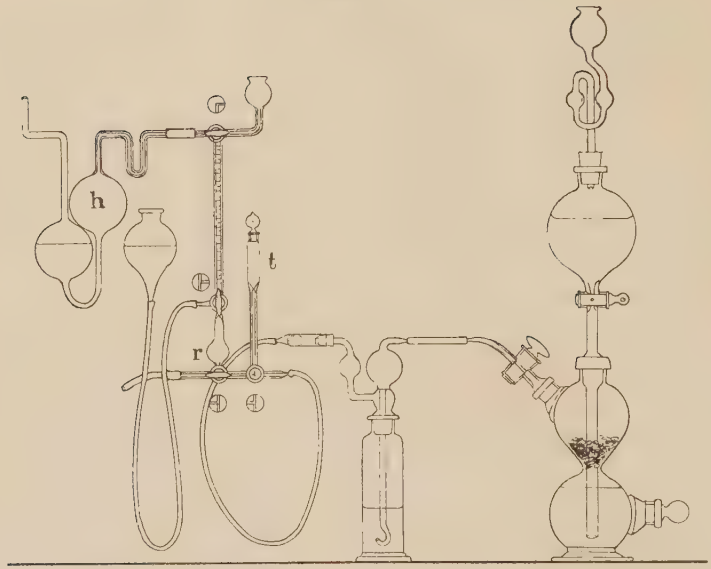
4. *Bestimmung von Amino-Stickstoff in den Gewebefettstoffen.*

Ich versuchte zur Bestimmung von Amino-Stickstoff der Gewebefettstoffe die Van Slyke'sche Methode, aber es gelang nicht, da der Amino-Stickstoff in den Gewebefettstoffen in nur kleinen Mengen enthalten ist. Aber vor einiger Zeit verbesserte Nakashima (1932) die Van Slyke'sche Methode und man kann durch seine Methode aus geringen Mengen von Aminosäure den Amino-Stickstoff bestimmen.

Weil ich diese Methode prüfte und sehr genau stimmende Resultate erzielte, benutzte ich diese Methode nun zur Bestimmung von Amino-Stickstoff des Gewebefettes und gebe unten meine Resultate bekannt.

Die Nakashima-Methode ist wie folgt: Nakashima ver-

Fig. 1.



besserte den Van Slyke'schen Apparat (Fig. 1) und bestimmte auf folgende Weise den Amino-Stickstoff: Er füllte 1 ccm Wasserlösung der Aminosäure in *t* ein, die dann in den Reaktionskolben *r* eindrang. Auf dieselbe Weise füllte er als nächstes 1 ccm Eisessigsäure ein, spülte dann *t* mit 2 ccm Wasser, was auch in den Reaktionskolben eindrang. Dann füllte er in *t* 2 ccm Natriumnitritlösung ein. In *t* und *r* führte er Kohlensäure ein, um die im Reagens und der Untersuchungsflüssigkeit enthaltene Luft zu entfernen, liess dann die in *t* enthaltene Natriumnitritlösung in den Reaktionskolben nachdringen, mischte es gut, liess es während 3 Min. ruhig stehen und schüttelte es dann 1 Minute lang heftig. Das entstehende Gas wird in die alkalische Permanganatlösung enthaltende Saugkugel *h* geleitet, nach Schütteln in die Gasbürette zurückgeleitet, die Volumen abgelesen und aus der Temperatur und dem Luftdruck die Menge des Amino-Stickstoffes berechnet.

Nach meinen Ergebnissen bei der Bestimmung von Amino-Stickstoff des Glykokolls (Glykokoll wurde bei 97°C während 4 Stunden gründlich getrocknet), wie Tabelle VIII zeigt, wurde aus

weniger als 0,04 mg Amino-Stickstoff enthaltender Aminosäure 97–103% von dem theoretischen Wert erzielt.

Tabelle VIII.

Glykokoll mg	Aminostickstoff (Theoretisch.) mg	Gasmenge		Aminostickstoff (Gefunden)		Temperatur und Luftdruck
		Blindversuch ccm	Gefunden ccm	mg	%	
0,1885	0,035	0,03	0,09	0,036	103	12° C
„	„	„	„	0,036	103	771 mm
0,1905	0,036	„	„	0,035	97	
„	„	„	„	0,035	97	20° C
„	„	„	„	0,035	97	767 mm
„	„	„	„	0,035	97	

Bestimmung des Amino-Stickstoffes in den Gewebefettstoffen: Bevor ich die Nakashima-Methode zur Bestimmung des Amino-Stickstoffes im Gewebefettstoffe benutzte, wollte ich von verschiedenen Seiten diese Methode ausprobieren.

Ich versuchte zuerst, wie man eine Lösung der Gewebefettstoffe erzielen und diese vollkommen in den Reaktionskolben einführen kann. Zu diesem Zweck verfertigte ich ein Spitzglas mit einem Glasstöpsel, wie die Abbildung (Fig. 2) zeigt. Der Durchmesser desselben beträgt 2,2 cm, die kleine Spitze verschmälert sich zu einem Durchmesser von 1,2 cm und bei einem Inhatl von 1 ccm wird das Glas gezeichnet. Man extrahiert wie gewöhnlich das Organ mit Alkohol-Äther, gibt die Flüssigkeit in einen 100 ccm fassenden Kjeldahlkolben und lässt sie unter Vakuum verdampfen. Die wiederum mit reinem Äther extrahierte Flüssigkeit filtriert man in das Spitzglas, lässt den Äther verdampfen, gibt zu dem Rückstand ungefähr 0,2 ccm Alkohol, erwärmt und löst ihn auf, gibt 2 ccm angewärmtes Wasser hinzu, verschliesst das Glas mit einem Stöpsel und schüttelt es heftig. Diese Flüssigkeit

Fig. 2.

lässt man in einem Wasserbad bis auf 1 ccm verdampfen, und verwendet diese zur Untersuchung. Wenn man den Amino-Stickstoff aus einer Alkohol enthaltenden Flüssigkeit bestimmen will, dringt der Alkohol, von der Kaliumpermanganatlösung nicht aufgenommen, mit dem Stickstoffgas in die Gasbürette ein, sodass der Alkohol bei der Bestimmung von grosser Störung ist. Die 0,2 ccm Alkohol gehen aber ganz verloren, wenn man die dem Alkohol beigefügten 2 ccm Wasser bis auf 1 ccm verdampfen lässt. Diese so gewonnene 1 ccm Untersuchungsflüssigkeit führt man bei *t* in den Apparat ein, lässt sie darauf in den Reaktionskolben vordringen; das Spitzglas spült man mit 2 ccm Wasser und führt auch dies durch *t* in den Reaktionskolben ein. Wenn man so das Waschwasser des Spitzglases von *t* bis in den Reaktionskolben vordringen lässt, wird die zu untersuchende Flüssigkeit vollkommen in den Reaktionskolben überführt.

Ich benutzt zur Untersuchung das Hirn vom Huhn. Man extrahiert 0,3 g frisches Hirn mit Alkohol-Äther, füllt den Extrakt im Messkolben genau zu 100 ccm auf und gibt je 10 ccm dieser Flüssigkeit zu einer Untersuchung in einen 100 ccm fassenden Kjeldahlkolben, lässt sie unter Vakuum verdampfen, extrahiert sie wiederum mit reinem Äther. Darauf filtriert man die Flüssigkeit durch einen Asbestfilter in das Spitzglas, lässt sie verdampfen, löst dann wiederum mit Alkohol auf. Man fügt dazu warmes Wasser und schüttelt, dann treibt man den Alkohol aus. Diese Wasserlösung verwendet man zur Untersuchung.

Tabelle IX.

Versuch	Zeitdauer des Stehenlassens Min.	Zeitdauer der Schüttelung Min.	Gasmenge		Amino-stickstoff		Temperatur 28° C Luftdruck 760 mm
			Blind-versuch ccm	Gefunden ccm	mg	%	
1	3	1	0,03	0,10	0,038	0,013	
2	3	2	„	0,11	0,044	0,015	
3	3	3	„	0,10	0,038	0,013	
4	5	1	„	0,10	0,038	0,013	

Wie Tabelle IX zeigt, ist die Zeitdauer des Stehenlassens und des Schüttelns genau wie beim Gewinn des Amino-Stickstoffes aus Aminosäure, d. h. nachdem man die zu untersuchende Flüssigkeit und das Reagens vereinigt hat, lässt man die Flüssigkeit 3 Min. stehen und schüttelt sie 1 Minute.

Wie im Vorhergehenden bereits erwähnt, ist bei der Extraktion der Fettstoffe die Mischung der gleichen Mengen von reinem Alkohol und Äther am besten als Lösungsmittel, aber es ist fraglich, ob sich die Amino-Stickstoff enthaltenden Fettstoffe auch mit dem gleichen Lösungsmittel vollkommen extrahieren lassen. Deshalb versuchte ich Extraktionen des Hirns mit der Mischung der verschiedenen Menge jedes Alkohols und Äthers, um festzustellen, mit welchem Lösungsmittel der meiste Amino-Stickstoff gewonnen werden kann.

In Tabelle X, bei Nr. 3, sind 90%iger Alkohol und wasserhaltiger Äther vermischt zur Extraktion angewandt worden, aber die Verdampfung unter Vakuum wird durch Schaumbildung unmöglich. Daher verwendet man zur Extraktion der amino-stickstoffhaltigen Fettstoffe aus dem Gewebe entweder eine Mischlösung gleicher Mengen von reinem Alkohol und Äther, oder eine Mischlösung gleicher Mengen von reinem Alkohol und wasserhaltigem Äther.

Tabelle X.

Versuch	Menge d. Huhn-Gehirns g	Konzentration des Alkohols	Konzentration des Äthers	Gasmenge		Aminostickstoff		Temperatur 24°C Luftdruck 756 mm
				Blindversuch ccm	Gefunden ccm	mg	%	
1	0,5	rein	rein	0,03	0,17	0,078	0,016	
2	0,5	rein	Wasserhaltig	„	0,17	0,078	0,016	
3	0,5	90 %	„	„	—	—	—	

Ferner dachte ich, dass ein besserer Erfolg erzielt wird, wenn die Menge des Äthers bei der Extraktion den des Alkohols übersteigt, weil Alkohol die Amino-Stickstoff liefernden Gewebefettstoffe fällt. Aus Tabelle XI ersieht man, dass das Verhältnis von Alkohol

Tabelle XI.

Material	Verhältnis von Alkohol- und Äther-Menge		Gasmenge		Aminostickstoff		Temperatur 12° C Luftdruck 760 mm
	Alkohol	Äther	Blind-versuch ccm	Gefunden ccm	mg	%	
0,5 g Huhn-Gehirn	1	1	0,03	0,11	0,047	0,009	
	1	3	„	0,11	0,047	0,009	
	1	5	„	0,06	0,018	0,004	

und Äther 1:1, oder 1:3 am geeignetsten ist; wenn der Alkohol weniger ist als der Äther, verliert auch der durch Extraktion aus den Fettstoffen gewonnene Amino-Stickstoff an Wert.

Bestimmungsmethode des Amino-Stickstoffs im Gewebefett: Mit reinem Alkohol und Äther (1:1) extrahiert man ungefähr 0,2–0,5 g Material, filtriert dasselbe in einen 100 ccm fassenden Kjeldahlkolben, gibt zu dem Rückstand reinen Äther, worauf man die Extraktionsflüssigkeit in das von mir erdachte Spitzglas filtriert. Nachdem der Äther langsam verdampft ist, fügt man 0,2 ccm reinen Alkohol dazu, wärmt sie an und löst sie auf, fügt dazu 2 ccm Wasser und schüttelt gut. Darauf taucht man das Spitzglas in ein 80–90°C Wasserbad, schüttelt es mehrmals und lässt die Flüssigkeit bis auf 1 ccm verdampfen. Die so erzielte 1 ccm Untersuchungsflüssigkeit füllt man in den Reaktionskolben des Mikro-Amino-Stickstoff-Bestimmungsapparates, fügt dazu 10 Tropfen Amylalkohol, 1 ccm Eisessig, vermischt es gut, dann spült man das Spitzglas mit 2 ccm Wasser, was man auch in den Reaktionskolben füllt. Durch die Natriumnitritlösung und die im Reaktionskolben enthaltene Flüssigkeit führt man während 1 Min. Kohlensäure, entfernt dadurch die vorhandene Luft, lässt, nachdem sich die Flüssigkeit und die Natriumnitritlösung vereinigt haben, das Ganze 3 Min. lang stehen, schüttelt es dann 1 Min. lang heftig, leitet das dadurch entstandene Gas in die Permanganatlösung und schüttelt es wiederum 1 Min. lang. Die ausser Stickstoff entstandenen Gase werden aufgesogen, der Stickstoff kehrt in die Gasbürette zurück, man liest das Volumen ab und berechnet nach Temperatur und Luftdruck die Stickstoffmenge.

5. *Bestimmung der Gewebsphosphatide.*

Es sind verschiedene Bestimmungsmethoden der Phosphatide zu erwähnen: Oxydationsmethode nach Bloor (1929), die von Katsura, Hatakeyama und Tajima (1933) verbesserte Bloorsche Oxydationsmethode, Kolorimetrie nach Bell und Doisy (1920), Gravimetrie nach Embden (1921) und Titrationsmethode nach Iversen (1920) u.s.w. Ich wählte unter den genannten Bestimmungsmethoden der Phosphorbestimmung die Titrationsmethode nach Iversen und prüfte sie nach. Dabei konnte ich aber nicht das Resultat von Iversen erreichen, so dass sich natürlicherweise verschiedene Fragen erhoben.

Inzwischen gelang es Ishibashi (1929), bis auf 0,003 g P_2O_5 zu bestimmen, indem er das als die beste Volumetrie der Phosphorsäure anzusehende Pembertonsche Verfahren verbesserte. So kam mir der Gedanke, dass es sehr geeignet wäre, es bei der Bestimmung noch kleinerer Mengen von Phosphorsäure heranzuziehen. So wurde daraufhin untersucht, zu entscheiden, welche der beiden Methoden bei unseren Experimenten zur Bestimmung des Phosphatidphosphors zu verwenden wäre, indem ich zuerst die Iversensche Methode auf die Einzelheiten, dann die Ishibashische auf ihre Anwendbarkeit zur Mikrobestimmung prüfte.

(*a*) *Verbesserte Iversensche Methode.*

Neumann (1903) ging in der Art vor, dass in der mit Schwefelsäure gesäuerten Lösung Ammoniumphosphomolybdat zum Niederschlag gebracht, dann mit 0,5 *N*-Natronlauge titriert, aus ihrer Menge die Menge der Phosphorsäure errechnet wurde. Iversen (1920) titrierte mit 0,04 *N*-Natronlauge, wobei die chemische Reaktion wie folgt stattfindet $2(NH_4)_3PO_4.24MoO_3 + 56NaOH = 24Na_2MoO_4 + 4NaNO_3 + 2Na_2HPO_4 + 32H_2O + 6NH_3$. Wenn man den experimentellen Faktor 0,0445 (der theoretische Faktor ist 0,0443) mit der verbrauchten 0,04 *N*-Natronlaugemenge (ccm) multipliziert, so erhält man die Phosphormenge (mg). Ich stellte unter der Annahme, dass die oben angeführte Reaktion richtig wäre, folgendes Experiment an.

Eine bestimmte Menge wässerige K_2HPO_4-Lösung wird in

einen 100 ccm fassenden Kolben gebracht und darin konzentrierte Schwefelsäure 1 ccm, dann eine beliebige Menge Wasser hinzugesetzt und ins Wasserbad bei 80° C eingetaucht. 10 Minuten danach werden in gleicher Weise erwärmte 50%ige Ammoniumnitratlösung und 10%ige Ammoniummolybdatlösung solange zugesetzt und stark geschüttelt, bis sich der gelbe Niederschlag zur Genüge bildet. Dann wird das Gemisch 10 Minuten lang ins Wasserbad gestellt, nach starkem Schütteln bei Zimmertemperatur abgekühlt. Auf den Hinweis von Iversen und die eigene Erwägung fussend geht man weiter vor: der Niederschlag wird abfiltriert und mit kaltem Wasser gut gewaschen, bis Lackmuspapier durch das Filtrat über eine Minute keine Verfärbung aufweist. Meiner Erfahrung nach werden dazu ca. 150 ccm Wasser in Anspruch genommen. Nach Beendigung des Waschens wird das Filtrierpapier mit einer Pinzette vorsichtig gefasst und in einen 100 ccm fassenden Becher übertragen. Eventuelle Beschmutzung des oberen Randes des Trichters mit dem Niederschlag wird mit Wasser gut abgewaschen und das Waschwasser in den Becher mitgenommen. Der Inhalt desselben wird ungefähr bis zu 30 ccm aufgefüllt. Nachdem das Filtrierpapier mit einem Glasstäbchen zerkleinert worden ist, wird 0,04 *N*-Natronlauge unter Umrühren so lange eingeträufelt, bis die gelbe Farbe zum Verschwinden kommt. Zum Abdampfen des Becherinhaltes verwendete Iversen das Sandbad, während ich dafür das Wasserbad benutzte, in dem der Inhalt bis zur Hälfe der Ausgangsmenge unter Umrühren mit dem Glasstäbchen eingedickt wurde. Dahinein wurden dann 2 Tropfen Phenolphthalein eingeträufelt und mit 0,04 *N*-Natronlauge neutralisiert. Ferner wurde der Becher ins siedende Wasserbad gesteckt, um seinen Inhalt zum vollständigen Abdampfen zu bringen. Dann wird der Becher im Leitungswasser abgekühlt. Der an dem Glasstäbchen anhaftende Säurerest wird mit Wasser in den Becher hineingewaschen, dessen Inhalt bis zu 30 ccm aufgefüllt wird. Der Überschuss an Säure wird mit Natronlauge titriert.

Quantitative Verhältnisse der zur Bildung des Niederschlags von Ammoniumphosphomolybdate entsprechenden Reagenzien: Da der Hinweis von Iversen auf die Niederschlagbildung von

Ammoniumphosphomolybdate bei meinen eigenen Experimenten nicht zu Recht bestand, so wollte ich auf gewisse quantitative Verhältnisse der zum Niederschlag benötigen Reagenzien hin untersuchen, indem ich Wasser, Ammoniumnitrat und Ammoniummolybdat in verschiedener Menge zur Verwendung brachte. (Tabelle XII)

Tabelle XII.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Con. H_2SO_4 ccm	Ammoniumnitrate ccm	Ammoniummolybdate ccm	Die zur Auflösung des Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Neutralisierung der überschüssigen NaOH benötigte 0,04 N-H_2SO_4 ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen H_2SO_4 benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Phosphor-Menge (Gefunden)	
								mg	%
1	0,0463	1	3	3	3	3	0,41	0,0182	39
2	„	„	„	4	„	„	0,95	0,0423	91
3	„	„	„	5	„	„	1,06	0,0472	102
4	„	„	„	„	„	„	1,00	0,0445	96
5	„	„	„	3	„	„	0,93	0,0414	87
6	„	„	6	4	„	„	1,05	0,0467	101
7	„	„	„	„	„	„	1,04	0,0463	100
8	„	„	„	5	„	„	1,00	0,0445	96
9	„	„	„	„	„	„	1,03	0.0459	99
10	0,0378	„	3	„	„	„	0,81	0,0360	95
11	0.0756	„	„	„	„	„	1,72	0,0765	101
12	„	„	„	„	„	„	1,63	0,0725	96
13	0,0418	„	6	4	„	„	0,89	0,0396	95
14	„	„	„	5	„	„	0,95	0,0423	101
15	„	„	„	10	„	„	0,96	0,0427	101

Wie aus Nr. 1, 2 und 5 zu ersehen ist, war der experimentelle Wert beim Zusatz von 3–4 ccm Ammoniummolybdate zu 3 ccm Ammoniumnitrate gegenüber dem theoretischen viel geringer, während sich derjenige der in den anderen Nummern angegebenen Experimente gegenüber dem letzteren 85–102% verhielt. Also ist

es angezeigt, dass beim Phosphorgehalt von 0,03–0,08 mg 5–10 ccm Wasser, 3–6 ccm Ammoniumnitrate 4–10 ccm Ammoniummolybdate, 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzugesetzt wird. Nach Iversen betrug die optimale Temperatur zur Niederschlagbildung von Ammoniumphosphomolybdaten 70–80°C. Daran anschliessend erreichte ich auch bei Erzeugung von Niederschlag bei 80°C ein gutes Resultat, was sich auch bei 90°C, probeweise unter sonst gleichen Bedingungen ausgeführt, ergab. (Tabelle XIII)

Tabelle XIII.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Ammonium nitrate ccm	Ammonium molybdate ccm	Phosphor-Menge (Gefunden)	
				mg	%
1	0,0418	6	4	0,0414	99
2	0,0418	6	5	0,0414	99
3	0,0418	6	6	0,0432	103

Veraschung durch Schwefelsäure und rauchende Salpetersäure: Zur Veraschung wurden Schwefelsäure und Salpetersäure verwendet, indem ich mich der Neumannschen Methode bediente. Vorerst wurde anorganische Phosphorverbindung (K_2HPO_4) derart verascht, wie es bei organischen Verbindungen der Fall ist. Eine bestimmte Menge wässeriger K_2HPO_4-Lösung wurde in einem Mikrokjeldahlkolben abgedampft, dann 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzugesetzt, mit schwacher Flamme etwa 5 Minuten erhitzt, bei Zimmertemperatur abgekühlt, ferner mit 0,5 ccm rauchender Salpetersäure versetzt, mit etwas stärkerer Flamme wieder erhitzt. Sobald das im Kolben entstandene braune Gas fast zum Verschwinden kam, wurde weiter 5 Minuten mit gleicher Flamme erhitzt. Nach Abkühlung wurden 5 ccm Wasser hinzugesetzt und mit kleiner Flamme solange zur Abdampfung gebracht, bis das Wasser fast zum Verschwinden kam. Nach Abkühlung bei Zimmertemperatur wurden etwa 10 ccm Wasser hinzugesetzt, um den Niederschlag auf obengenannte Weise zu gewinnen, und es wurde quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle XIV wiedergegeben.

Tabelle XIV.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Phosphor-Menge (Gefunden)	
		mg	%
1	0,0378	0,0360	95
2	0,0378	0,0383	101

Die Menge der zur Auflösung des gelben Niederschlags benötigten Natronlauge: Wenn es sich um eine Phosphormenge von 0,03–0,08 mg handelt, so reicht die zur Auflösung des gebildeten gelben Niederschlags von Ammoniumphosphomolybdate erforderliche 0,04 *N*-Natronlauge mit der Menge von 3 ccm aus.

Bei einer kleineren Phosphormenge, z. B. 0,01 mg wurde sehr wenig gelber Niederschlag von Ammoniumphosphomolybdaten gebildet, dessen Farbe man nach Filtration und Waschen fast nicht mehr erkennen kann. Dann wurde das Filtrierpapier in den Becher übertragen, unter Zusatz von etwa 10 ccm Wasser zerstückt. Nach dem Verschwinden des gelben Niederschlags durch Zusatz von 0,04 *N*-Natronlauge wurde weiter in der Menge von 0,4 ccm hinzugesetzt wie Iversen zeigte, der Becher ins siedende Wasserbad gestellt, um die Hälfte des Becherinhaltes abzudampfen. Da dabei durch Einträufelung von Phenolphthalein keine rote Farbe auftrat, wurde 1 ccm 0,04 *N*-Natronlauge hinzugesetzt, wodurch der Zweck erreicht war. Auf diese Weise wurde 1 ccm Natronlauge als die minimale Dosis festgestellt. Wenn man den Überschuss von Natronlauge mit gewisser Säure neutralisieren will, so erhält man durch Zusatz von 1 ccm 0,04 *N*-Schwefelsäure gegen 1 ccm Natronlauge den Wert, der dem theoretischen am nächsten kommt. (Tabelle XV).

Wenn es sich um einen grösseren Phosphormenge z. B. 0.1 mg handelt, so wird der gelbe Niederschlag mit 3 ccm von 0,04 *N*-Natronlauge ausser Sicht gebracht. Diesem Wert gegenüber war die Menge der 0,04 *N*-Schwefelsäure bei Nr. 2 in der Tabelle XVI am optimalsten und stimmte mit dem theoretischen fast gut überein. Bei Nr. 3 war die den Überschuss der Natronlauge neutralisierenden

Tabelle XV.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Die zur Auflösung des Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Neutralisierung der überschüssigen NaOH benötigte 0,04 N-H_2SO_4 ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen H_2SO_4 benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Phosphor-Menge (Gefunden) mg	Differenz von der theoretischen und gefundenen mg
1	0,01	1	0,45+0,4	0,19	0,0151	+0,0051
2	„	„	0,75	0,17	0,0187	+0,0087
3	„	„	1,00	0,29	0,0129	+0,0029

Schwefelsäuremenge zu gross, so dass bei der Beendigung der Abdampfung des Becherinhaltes der gelbe Niederschlag in Erscheinung trat und der experimentelle Wert dem theoretischen gegenüber eine beträchtliche Abnahme erfuhr.

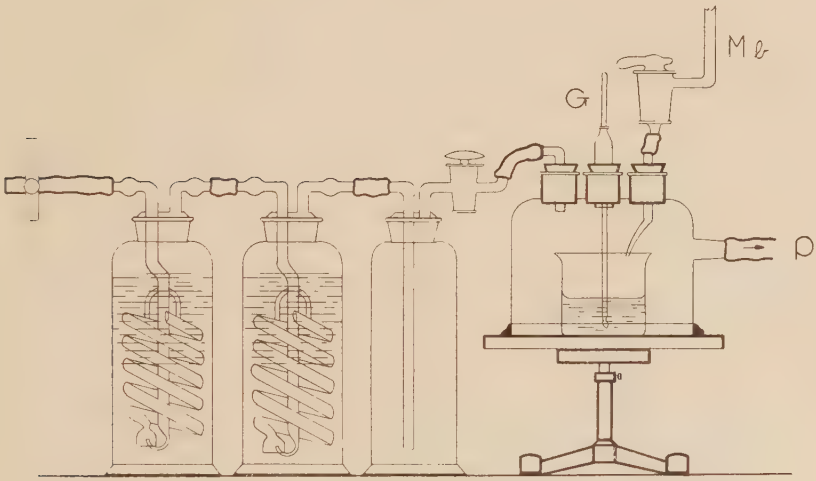
Tabelle XVI.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Die zur Auflösung des Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Neutralisierung der überschüssigen NaOH benötigte 0,04 N-H_2SO_4 ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen H_2SO_4 benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Phosphor-Menge (Gefunden) mg	Differenz von der theoretischen und gefundenen mg
1	0,1	3	1,5	1,01	0,112	+0,012
2	„	„	2,0	1,23	0,0992	−0,0008
3	„	„	2.5	1,33	0,0813	−0,0187

Wenn man bei der geringen Menge von Phosphor, welche den gelben Niederschlag von Ammoniumphosphomolybdate kaum nachweisen liess, also 0,01 -0,03 mg, 1 ccm von 0,04 *N*-Natronlauge hinzusetzt und 1 ccm von 0,04 *N*-Schwefelsäure einträufelt und bei der Phosphormenge 0,03–0,1 mg, welche den gelben Niederschlag deutlich feststellen liess, zur Auflösung desselben 3 ccm von 0,04 *N*-Natronlauge und ca. 2 ccm von 0,04 *N*-Schwefelsäure einträufelt, so kann man den mit dem theoretischen fast übereinstimmenden Wert eruieren.

Titrationsmethode unter Absperrung von Kohlensäure: Es ist wohlbekannt, dass die Endreaktion bei der Neutralisation von Säure mit Alkali durch Kohlensäure in der Luft beeinflusst wird, was desto ausgeprägter in Erscheinung tritt, je verdünnter die verwendete Natronlauge ist. Zum guten Resultate titrierte ich in einem Apparat (Fig. 3). Wie die beiliegende Abbildung zeigt,

Fig. 3.



wird der Eingang der mit Natronlauge gefüllten Bürette in die Glasglocke gesteckt und die Natronlauge eingeträufelt mit einem in die Glocke reichenden Glasstäbchen umgerührt, indem man die mit Säure und Alkali gut gewaschene Luft mittels Wasserpumpe in die Glocke einleitete. Wenn der Becherinhalt dauernd 30 Sekunden lang rote Verfärbung beibehält, so sieht man dabei die Endreaktion.

Gewebsphosphatide: Ein bestimmtes Quantum Hühnergehirn wurde mit einer bestimmten Menge Alkohol-Äther-Gemisches extrahiert. Der Extrakt wird in 100 ccm Kjeldahlkolben genommen, unter niedrigem Druck abgedampft. Der Rückstand wurde mit reinem Äther extrahiert und durch Asbestfilter in einen anderen Kjeldahlkolben abfiltriert, Äther abgedampft. Der

Rückstand wurde mit konzentrierter Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure verascht. Nach Abkühlung bei Zimmertemperatur wurden Wasser hinzugesetzt und im Wasserbad bei 80–90°C erwärmt. 10 Minuten danach wurde ebenso erwärmtes 50% Ammoniumnitrat und 10% Ammoniummolybdat hinzugefügt, gut geschüttelt und weiter 10 Minuten erwärmt. Der gewonnene gelbe Niederschlag wurde bei Zimmertemperatur abgekühlt, mit aschfreiem Filter abfiltriert. Nach genügendem Waschen mit kaltem Wasser (0–4°C) wurde der Niederschlag samt dem Filtrierpapier in 100 ccm Becher übertragen, mit Glasstäbchen zerstückt, ca. 40 ccm Wasser hinzugefügt. Als der Niederschlag durch Einträufelung von 0,04 *N*-Natronlauge zum Verschwinden kam, wurde die Probe im siedenden Wasserbad bis zur Hälfte abgedampft, unter Zusatz von 2 Tropfen Phenolphthalein 0,04 *N*-Schwefelsäure titriert. Weiter wurde der Becherinhalt im siedenden Wasserbad vollständig abgedampft, im fliessenden Wasser abgekühlt, mit Wasser bis auf ca. 30 ccm aufgefüllt, sodann der Säureüberschuss mit 0,04 *N*-Natronlauge titriert. Wie in den Tabelle XVII

Tabelle XVII.

Material	Die zur Auflösung des Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Neutralisierung der überschüssigen benötigte 0,04 N-H_2SO_4 ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen H_2SO_4 benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Phosphor-Menge	
				mg	%
100 ccm Extrakt aus dem 1 g Huhn-Gehirn, davon je 10 ccm	2	1,1	0,3	0,0534	0,053
	2	1,0	0,23	0,0547	0,055

ersichtlich, betrug die Menge des Phosphatidphosphors von 0,1 g Hühnergehirn 0,053–0,055 mg.

(*b*) *Verwendung der Ishibashischen Methode zur Mikrobestimmung.*

Ishibashi (1929) veröffentlichte verschiedene Phosphor-

bestimmungsmethoden, von denen besonders Volumetrie mich in hohem Masse gerade deshalb interessierte, da ich vorhatte, die Iversensche Methode zu verwenden. So fand ich es nicht überflüssig, den Umriss der Volumetrie hier zu skizzieren.

Der neutralen Phosphatlösung wurde Ammoniummolybdatlösung in einer 2 fachen Menge gegenüber dem theoretischen Wert hinzugesetzt. Die Lösung wurde auf das Volumen von ca. 60 ccm gebracht, um dann je 20 ccm von 5 *N*-Ammoniumnitrat und 5 *N*-Salpetersäure hinzuzufügen, wodurch man ungefähr die Konzentration von 1 *N*-Lösung erhalten kann. Die Probe wurde gut umgeführt, sofort in das Wasserbad übertragen, bei 50–60°C etwa 5 Minuten lang erwärmt, nach mehrmaligem Umrühren abgekühlt. Nach etwa 3 Stunden wurde der Niederschlag durch Dekantieren auf das kleine Filtrierpapier übertragen, mit 1% Kaliumnitrat-Lösung gewaschen. Das Filtrierpapier wurde in denselben Becher übertragen. Dann wurde der Niederschlag mit 0,1 *N*-Natronlauge aufgelöst, deren Überschuss mit 0,1 *N*-Salzsäure zurücktitriert. Das Volumen (ccm) der dabei gebrauchten 0,1 *N*-Natronlauge mal Faktor 0,000303 zeigt das erwünschte Gewicht (g) von P_2O_5. Die dabei sich abspielende Reaktion ist folgende. $2(NH_4)_3PO_4.12MoO_3 + 46NaOH = 2(NH_4)_2HPO_4 + (NH_4)_2MoO_4 + 23Na_2MoO_4 + 22H_2O$. Nach dieser Methode soll sich P_2O_5 bis 0,003 g genau bestimmen lassen.

Da die von mir zu bestimmende Phosphormenge aber 0,01–0,1 mg beträgt und deshalb diese Methode nicht ohne weiteres zur Verwendung gezogen werden kann, so habe ich das Volumen von Phosphorsäurelösung, Ammoniumnitrat und Salpetersäure mässig vermindert angewendet. So wurde Phosphorsäurelösung in der Menge von 15 ccm verwendet, je 5 ccm von Ammoniumnitrat und Salpetersäure hinzugesetzt. Jede Lösung wurde also nach der Vorschrift bei der Ishibashischen Methode 1 *N*-Konzentration gemacht. Die Menge von Ammoniumphosphomolybdate betrug nach Ishibashi ca. 2 fach grosse Dosis gegenüber dem theoretischen Wert, also bei dem Phosphorsäuremenge 0,1 mg entwickelte sich der gelbe Niederschlag erst durch Zusatz von 2–3 ccm von 7% Ammoniummolybdate. Auch bei 0,00988 mg Phosphorsäure wurde

Tabelle XVIII.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Wasser ccm	7% Ammonium-molybdat ccm	5 N-Ammonium-nitrate ccm	5 N-NHO_3 ccm	Gelbliches Niederschlag
1	0,1	14,7	0,3	5	5	—
2	„	14,4	0,6	„	„	—
3	„	14,1	0,9	„	„	—
4	„	13,0	2,0	„	„	+
5	„	12,0	3,0	„	„	+
6	0,00988	14,0	1,0	„	„	—
7	„	13,0	2,0	„	„	+
8	„	12,0	3,0	„	„	+

der Niederschlag ebenfalls bei 2–3 ccm gebildet (Tabelle XVIII). Da auf dieser Weise Ammoniumphosphormolybdate in einem ziehmlich grossen Überschuss hinzugefügt werden müssen, so werden selbstverständlich $MoO_3 2H_2O$ und $NH_2NO_3.4MoO_3$ etc. mitniedergerissen {Ishibashi (1929)}.

Welchen Einfluss werden nun solche Niederschläge auf die Volummetrie ausüben? An Hand der obengenannten Methode wurde bei Phosphorsäuremenge von 0,01–0,1 mg 2 ccm Ammoniummolybdate zugesetzt, mit Wasser auf 15 ccm gebracht und je 5 ccm von Ammoniumnitrat und Salpetersäure beigefügt, das Ganze wurde erwärmt. Nach Abkühlung wurde die Probe abfiltriert, mit 1% Kaliumnitrat-Lösung gewaschen. Zur Auflösung des Niederschlages wurde 0,04 N-Alkali-Lösung anstatt der 0,1 *N*-Lösung bei Ishibashischer Methode verwendet. Der Überschuss von Alkali wurde mit 0,04 *N*-Salzsäure titriert und mit dem theoretischen Faktor 0,054 multipliziert, so erhält man die Phosphormenge (mg).

Da die Differenz zwischen dem theoretischen und dem gefundenen Wert, wie aus der Tabelle XIX ersichtlich sehr gering ist, hat das Vorhandensein der Niederschläge von $MoO_3 2H_2O$ und $NH_2NO_3.4MoO_3$ fast keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Weiter beeinflusste Veraschung mit Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure den Niederschlag von Ammonium-

Tabelle XIX.

Versuch	Phosphore-Menge (Theoretisch.) mg	Die zur Auflösung des Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen NaOH benötigte 0,04 N-HCl ccm	Phosphor-Menge (Gefunden) mg	Differenz der theoretischen u. gefundenen Menge mg
1	0,0988	3,00	1,16	0,0994	+0,0006
2	„	3,00	1,20	0,0972	−0,0016
3	0,0965	3,00	1,20	0,0972	+0,0007
4	„	3,00	1,21	0,0967	+0,0002
5	0,0772	3,00	1,62	0,0745	−0,0027
6	0,0386	2,00	1,30	0,0378	−0,0008
7	0,0193	2,00	1,62	0,0205	+0,0012
8	„	2,00	1,62	0,0205	+0,0012
9	„	2,00	1,65	0,0194	+0,0014
10	0,0097	2,00	1,78	0,0119	+0,0022
11	„	2,00	1,81	0,0103	+0,0006
12	„	2,00	1,81	0,0103	+0,0006

phosphomolybdat nicht: Eine bestimmte Menge K_2HPO_4 wurde in 100 ccm Kjeldahlkolben genommen, mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 0,5 ccm rauchender Salpetersäure, wie bei der Veraschung der organischen Substanz, verascht. Dann wurde es zur Niederschlagbildung von Ammoniumphosphomolybdate geführt, wobei wegen Anwesenheit von Schwefelsäure neben dem Niederschlag von $(NH_4)_3PO_4.12MoO_3.HNO_3.2H_2O$ der von $4\{(NH_4)_3Po_4.12MoO_3\}.(NH_4)_2SO_4.5MoO_3$ {Ishibaschi (1933)} gebildet wurde, was die Ishibashische Methode unverkennlich beweisen konnte. Daher wurde die Probe nach Veraschung zuerst mit 20% Natronlauge neutralisiert, Phenolphthalein als Indikator gebraucht, und in einen 50 ccm Becher übertragen. Der Kolben wurde mit etwa 2 ccm Wasser 2–3 mal gewaschen, das Waschwasser in den Becher gegossen, und der Becherinhalt wurde auf ca. 13 ccm gebracht, um dann, an das obenangeführte Verfahren der Niederschlagbildung anschliessend, 2 ccm von Ammoniummolybdat, und je 5 ccm Am-

moniumnitrat und Salpetersäure hinzuzufügen. Nach Erwärmung wurde kein Niederschlag entwickelt, aber die Zunahme von Ammoniummolybdat (1–3 ccm) liess den Niederschlag bilden. Zwar stellte dieser hauptsächlich $(NH_4)_3PO_4.12MoO_3.HNO_3.2H_2O$ dar, aber es kann noch eine kleine Menge $4\{(NH_4)_3PO_4.12MoO_3\}.(NH_4)_2SO_4.5MoO_3$ damit vermischt sein. Um diese zu entfernen, wurde der Niederschlag in Ammoniumwasser aufgelöst. Nach Neutralisierung des Ammoniums mit Salpetersäure wurde der Niederschlag wieder gebildet, wobei Ammoniummolybdate in der Menge von 2 ccm ausreichen kann.

Aus dem obigen Experiment geht hervor, dass 3 ccm von Ammoniummolybdate nötig sind, um aus der nach Veraschung mit Natronlauge neutralisierten Lösung gelben Niederschlag bilden zu lassen, und dass Ammoniummolybdate in Menge von 2 ccm ausreicht, wenn man den gelben Niederschlag in Ammoniumwasser löst und aus dieser Lösung wieder den gelben Niederschlag bilden lässt. Wenn man also auf diese Weise die Phosphormenge bestimmt, so stimmt der gefundene Wert fast mit dem theoretischen überein (Tabelle XX).

Gewebsphosphatide: Weiter wurde diese Methode zur Bestimmung der Phosphatide des Gewebes verwendet, wobei ich mich des Hühnergehirns bediente. Eine bestimmte Menge Gehirns wurde mit Alkohol-Äther-Gemisch extrahiert, eine bestimmte Menge des Extrakts im Kolben unter niedrigem Druck zum Abdampfen gebracht. Der Rückstand wurde wieder mit reinem Äther extrahiert, der Extrakt abgedampft. Der Rückstand wurde mit konzentrierter Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure verascht, dann mit 20% Natronlauge neutralisiert und in einen 50 ccm Becher gebracht, dann 7% Ammoniummolybdate, 5 *N*-Ammoniumnitrate und 5 *N*-Salpetersäure hinzugesetzt, nach Umrühren erwärmt, nach Abkühlung filtriert und der Niederschlag wurde in Ammoniumwasser gelöst, mit Salpetersäure neutralisert, dann lässt man wieder den Niederschlag bilden. Der Niederschlag wurde abfiltiert und mit Kaliumnitratlösung gewaschen. Das den Niederschlag behaltende Filtrierpapier wurde in den Becher übertragen, mit 0,04 *N*-Natronlauge aufgelöst, und der Überschuss von Natron-

Tabelle XX.

Versuch	Phosphor-Menge (Theoretisch.) mg	Erstemal Niederschlag			Zweitemal Niederschlag			Die zur Auflösung des Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen NaOH benötigte 0,04 N-HCl ccm	Phosphor-Menge (Gefunden) mg	Differenz von der theoretischen u. gefundenen Menge mg
		7 % Ammonium-molybdate ccm	5 N-Ammonium-nitrate ccm	5 N-HNO_3 ccm	7 % Ammonium-molybdate ccm	5 N-Ammonium-nitrate ccm	5 N-HNO_3 ccm				
1	0,0386	3	5	5	2	5	5	2	1,25	0,0362	−0,0024
2	0,0386	„	„	„	„	„	„	„	1,25	0,0362	−0,0024
3	0,0386	„	„	„	„	„	„	„	1,25	0,0362	−0,0024
4	0,0386	„	„	„	„	„	„	„	1,24	0,0367	−0,0019
5	0,0386	„	„	„	„	„	„	„	1,26	0,0356	−0,0030
6	Blindversuch	„	„	„	„	„	„	„	1,92	—	—

lauge mit 0,04 *N*-Salzsäure titriert. Wenn man das Volumen der zur Auflösung des Niederschlags benötigten 0,04 *N*-Natronlauge mit dem theoretischen Faktor 0,054 multipliziert, wird die Phosphormenge (mg) erhalten (Tabelle XXI).

Tabelle XXI.

Material	Versuch	Die zur Auflösung des gelblichen Niederschlags benötigte 0,04 N-NaOH ccm	Die zur Titrierung der überschüssigen NaOH benötigte 0,04 N-HCl ccm	Phosphormenge mg
100 ccm Extrakt aus dem 1 g Huhn-Gehirn, davon gebraucht je 10 ccm	1	3	1,70	0,0659
	2	„	1,66	0,0680
	3	„	1,64	0,0691
	4	„	1,66	0,0680
	5	„	1,65	0,0686
Blindversuch	6	3	1,92	—

Die von mir modifizierte Iversensche Methode und die Anwendung der Ishibashischen Methode zur Mikrobestimmung liessen ebenfalls den guten Erfolg der Mikrobestimmung erkennen. Bei der Niederschlagbildung von Ammoniumphosphomolybdate bediente sich Iversen der Schwefelsäure zur Ansäuerung, ohne Rücksicht auf ihren Einfluss, da nach Ishibashi bei Ansäuerung mit Schwefelsäure 2 Arten von Niederschlägen des Ammoniumphosphomolybdate gebildet wurden, die gegen Natronlauge ungenaue Reaktion zeigten, während bei der Erzeugung eines einzigen Niederschlags unter Ansäuerung mit Salpetersäure eine genauere Reaktion gegen Natronlauge in Erscheinung trat. Da in meinem Experimente zur Veraschung organischer Substanzen Schwefelsäure verwendet wurde, so ist es dringend nötig, die Niederschlagerzeugung von dem Einfluss der Schwefelsäure zu befreien. Das Verfahren bei der Niederschlagerzeugung ist bei der Ishibashischen Methode zwar mit dem lästigen Wiederniederschlagen verbunden, aber es ist sonst sehr einfach und in kurzer Zeit auszuführen, während die Iversensche Methode sich sehr kompliziert erweist.

Nach der Auflösung des Niederschlags durch Natronlauge wird bei der Iversenschen Methode längere Zeit in Anspruch genommen, um Ammoniak zu verjagen, was bei der Ishibashischen wegfällt. Ein Vergleich beider Methoden miteinander ergibt, dass zwar die von mir modifizierte Iversensche Methode, vom Resultat aus betrachtet, eine zuverlässige Methode darstellt, doch die von mir zur Mikrobestimmung herangezogene Ishibashische Methode noch zuverlässiger zu sein scheint.

III. Tierexperiment.

Versuchstiere: 250–350 g schwere, etwa 10 Tage mit Hirse und frischem Wasser gefütterte, blaue oder bläulichgraue Tauben. Als Käfig wurde ein 35 cm langes, 45 cm breites und 45 cm hohes Drahtgestell mit auswechselbarem Boden aus Bambus benutzt.

Fütterung: Die Normal- und B-Avitaminosefütterung bestanden auf folgende Zusammenstellung nach dem Fujimaki'schen Rezept (1928).

a) Normalfütterung:	
Poliertes Reispulver	78%
Kasein	15%
Anorganische Salze	4%
Lebertran	3%
Trockene Hefe	2%
Rettich (Daikon)-saft	einwenig.
b) B_1B_2-Avitaminosefütterung:	
Poliertes Reispulver	78%
Kasein	15%
Anorganische Salze	4%
Lebertran	3%
Rettich (Daikon)-saft	einwenig.

Die B_1-Avitaminosefütterung von Chick (1929) bei Ratten habe ich mit geringer Abänderung wie folgt verwendet:

Stärke	81%
Eiweisspulver	12%
Anorganische Salze	4%
Cottonöl	7%
Lebertran	3%
Salze nach Fujimaki (1928):	
NaCl	6,5%
$Na_2HPO_4 : H_2O$	10,0%
K_2HPO_4	30,0%

$MgSO_4 : H_2O$	13,0%
Ca-lactate	37,0%
Ammonium-Fe-Citrate	3,0%
KI	einwenig.

Diese Nahrungen wurden nach Fujimaki (1928) gereinigt.

Fütterungsmethode: Von jeder Futterart wurden 15–20 g mit Wasser vermischt und einmal täglich gegeben, und das Wasser wurde freiwillig aufgenommen. Bei der Fütterung mit den B_1B_2- und B_1-avitaminotischen Nahrung nahm das Körpergewicht stark ab, und man musste die damit verbundenen Veränderungen der Fettstoffe berücksichtigen; es wurde also mit den nur mit Wasser gefütterten, hungernden Tauben experimentiert. Da es sehr wichtig ist, den Käfig recht sauber zu halten, wurde der Boden einen Tag um den andern ausgewechselt. Um die Vermehrung oder Verminderung des Körpergewichts festzustellen, wurde alle 2–3 Tage einmal gewogen.

Isolierung der Nervengewebe: Nachdem der Kopf der Taube abgehackt und entblutet war, wurden sofort Gehirn, Rückenmark und Peripherienerven isoliert. Das ganze Gehirn wurde in einen Mörser getan, vollkommen zerdrückt und ein Teil (0,3–0,5 g) davon entnommen, vom Rückenmark nahm man 0,2–0,3 g. Als Peripherienerven wurden die Nerven der Flügel und Nervus ischiadicus zusammen genommen und alles verwendet.

Ergebnisse.

A. Allgmeinzustand der einzelnen Gruppen.

a) Normalgruppe: 12 Versuchsfälle (Tabelle XXII).

Da die Tauben die ersten 2–3 Tage, bis sie sich an das Futter gewöhnt hatten, sehr wenig zu sich nahmen, fiel das Körpergewicht etwas ab; doch nach einigen Tagen besserte sich die Fresslust und somit auch das Körpergewicht, und 5–10 Tage nach Beginn des Versuches bildete es sich zurück. 2–3 Tage nach Beginn des Experimentes zeigte sich in einigen Fällen Ausscheidung von grünem Kot, jedoch einige Tage später wurde der Kot wieder normal. Die Fütterungszeit bestand aus 19–53 Tagen; das Körpergewicht zeigte nach dem Töten im Vergleich zum Beginn des Versuchs bei wenigen

Fällen 29% Abnahme, im allgemeinen jedoch betrug diese nur 1–6% oder die Zunahme 1–8%.

Tabelle XXII.

Nahrung	Tier-nummer	Fütterungs-tage	Körpergewicht (g)		
			bei Beginn der Fütterung	bei Ende der Fütterung	% der Ab- od. Zunahme
Normale Fütterung	24 (♀)	25	305	299	−2
	28 (♀)	29	272	277	+2
	38 (♂)	31	317	308	−3
	40 (♂)	33	295	209	−29
	48 (♀)	39	300	304	+1
	49 (♀)	53	330	347	+5
	50 (♀)	23	272	268	−1
	51 (♀)	19	295	304	+3
	126 (♂)	29	310	290	−6
	127 (♂)	47	295	282	−4
	128 (♂)	37	365	355	−27
	129 (♂)	37	290	315	+8

b) B_1B_2-Avitaminosegruppe: 20 Versuchsfälle (Tabelle XXIII).

Einen Tag nach Beginn der Versuche nahmen die meisten Tauben nichts zu sich, vom 2. Tag an begannen sie aber Nahrung aufzunehmen. Das Körpergewicht nahm gleich zu Beginn eine Zeit lang ab, erholte sich dann wieder eine Zeit lang, nach einigen Tagen fiel es schliesslich allmählich ab. 2 Tage nach Beginn trat in vielen Fällen Ausscheidung von grünem, weichem Kot auf; nach 7–10 Tagen begann Appetitmangel und zu gleicher Zeit fiel auch das Körpergewicht plötzlich. Die Taube liess die Flügel hängen und verlor ihre Lebhaftigkeit, sie hatte Beschwerden beim Gehen, stand in der Ecke des Käfigs und zeigte Symptome der sogenannten Reiskrankheit (B-Avitaminose). Frühestens 13 und spätestens 49 Tage nach Beginn trat Krampf oder Lähmung auf. Die Abnahme des Körpergewichts betrug, verglichen mit dem vom Beginn, bei vielen 27–47%, doch gab es auch einige Fälle mit

10% oder 3%.

Tabelle XXIII.

Nahrung	Tiernummer	Fütterungstage	Körpergewicht (g)		
			bei Beginn der Fütterung	bei Ende der Fütterung	% der Ab- od. Zunahme
B_1B_2-avitaminotische Fütterung	11 (♂)	47	292	162	−45
	16 (♀)	43	304	160	−47
	25 (♂)	35	283	157	−41
	32 (♀)	15	290	185	−36
	33 (♀)	25	309	211	−32
	34 (♀)	29	290	170	−41
	45 (♂)	23	300	207	−31
	52 (♀)	15	265	258	−3
	53 (♀)	47	272	172	−36
	54 (♂)	49	290	195	−33
	55 (♀)	17	270	243	−10
	62 (♀)	33	270	168	−38
	112 (♂)	13	310	168	−45
	113 (♂)	15	380	270	−28
	122 (♀)	13	318	200	−37
	123 (♂)	43	330	183	−45
	124 (♀)	43	335	190	−43
	125 (♂)	39	345	224	−35
	132 (♀)	47	300	168	−44
	133 (♀)	47	312	227	−27

c) *B_1-Avitaminosegruppe: 12 Versuchsfälle (Tabelle XXIV).*

In den ersten 2–3 Tagen nahmen die Tauben nichts zu sich, doch einige Tage später war die Fresslust sehr lebhaft. Aber trotz der guten Futteraufnahme fiel das Körpergewicht. Es gab auch Fälle, die 5–7 Tage nach Beginn eine Gewichtszunahme zeigten, die aber bald wieder abnahm. Nach 7–20 Tagen trat Appetitmangel ein; die Tiere verloren ihre Lebhaftigkeit und wurden des Käfigs. Das Körpergewicht nahm plötzlich ab, und 21–50 Tage nach Beginn trat Lähmung oder Krampf ein. Der Prozentsatz der Gewichtsabnahme betrug, verglichen mit dem Gewicht beim Beginn,

33–50%.

Tabelle XXIV.

Nahrung	Tiernummer	Fütterungstage	Körpergewicht (g) bei Beginn der Fütterung	bei Ende der Fütterung	% der Ab- od. Zunahme
B_1-avitaminotische Fütterung	105 (♂)	23	375	235	−37
	106 (♀)	27	380	197	−48
	108 (♂)	23	369	222	−37
	114 (♀)	21	382	198	−48
	116 (♀)	35	299	148	−50
	117 (♀)	37	329	187	−43
	118 (♂)	23	332	200	−40
	119 (♂)	21	328	192	−41
	120 (♂)	41	310	165	−47
	121 (♀)	29	300	150	−50
	130 (♂)	59	330	222	−33
	131 (♀)	37	245	195	−43

d) Hungergruppe: 11 Versuchsfälle (Tabelle XXV).

Tabelle XXV.

Nahrung	Tiernummer	Fütterungstage	Körpergewicht (g) bei Beginn der Fütterung	bei Ende der Fütterung	% der Ab- od. Zunahme
Hunger	29 (♂)	13	320	198	−38
	31 (♀)	9	282	210	−26
	101 (♀)	11	300	183	−39
	102 (♀)	8	295	176	−40
	107 (♂)	10	320	197	−38
	109 (♂)	7	339	257	−24
	110 (♂)	9	354	189	−46
	134 (♂)	15	350	185	−47
	135 (♂)	11	300	160	−47
	136 (♂)	15	285	150	−47
	137 (♂)	11	287	125	−56

1–3 Tage fand Ausscheidung von grünlichem Kot statt und sofort begann Gewichtsabnahme. Die Tiere wurden sehr schwach und fielen nach 9–15 Tagen um. Die Gewichtsabnahme betrug, verglichen mit dem Beginn, 24–56%.

B. Die in den Nervengeweben enthaltenen Fettstoffe der einzelnen Fütterungsgruppen.

Fettstoffe des Gehirns:

a) Normalgruppe (Tabelle XXVI).

Die Gesamtfettsäure war bei 5 Fällen 3,1–4,2%, durchschn. 3,8%; das Gesamtcholesterin bei 6 Fällen 1,3–1,9%, durchschn. 1,5%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 3 Fällen 0,008–0,014%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 5 Fällen 0,048–0,064%, durchschn. 0,059%.

Tabelle XXVI.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
24	4,2	24	1,4	38	0,008	24	0,063
28	4,2	28	1,4	126	0,014	40	0,048
49	3,5	40	1,3	127	0,011	51	0,064
51	3,8	49	1,6	Mittelwert	0,011	128	0,059
129	3,1	51	1,5			129	0,063
Mittelwert	3,8	128	1,9			Mittelwert	0,059
		Mittelwert	1,5				

b) B_1B_2-Avitaminosegruppe: (Tabelle XXVII).

Die Gesamtfettsäure war bei 4 Fällen 3,1–3,5%, durchschn. 3,3%; das Gesamtcholesterin bei 7 Fällen 1,1–1,6%, durchschn. 1,4%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 5 Fällen 0,010–0,012%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 6 Fällen 0,046–0,066%, durchschn. 0,058%.

c) B_1-Avitaminosegruppe: (Tabelle XXVIII).

Die Gesamtfettsäure war bei 3 Fällen 2,8–3,3%, durchschn. 3,0%; das Gesamtcholesterin bei 5 Fällen 1,5–1,8%, durchschn. 1,6%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 5 Fällen 0,010–0,013%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 5 Fällen 0,042–0,060%, durchschn. 0,052%.

Tabelle XXVII.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %
25	3,5
54	3,4
55	3,3
62	3,1
Mittelwert	3,3

Tiernummer	Gesamtcholesterin %
11	1,5
16	1,5
25	1,3
33	1,1
54	1,6
55	1,5
62	1,5
Mittelwert	1,4

Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %
32	0,010
34	0,010
122	0,012
124	0,010
125	0,011
Mittelwert	0,011

Tiernummer	Phosphatidphosphor %
25	0,056
55	0,066
112	0,051
123	0,066
132	0,060
133	0,046
Mittelwert	0,058

Tabelle XXVIII.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %
120	3,0
130	3,3
131	2,8
Mittelwert	3,0

Tiernummer	Gesamtcholesterin %
105	1,6
114	1,5
120	1,5
130	1,8
131	1,6
Mittelwert	1,6

Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %
108	0,010
117	0,013
118	0,010
119	0,012
121	0,012
Mittelwert	0,011

Tiernummer	Phosphatidphosphor %
105	0,054
114	0,042
120	0,060
130	0,060
131	0,042
Mittelwert	0,052

d) *Hungergruppe:* (*Tabelle XXIX*).

Die Gesamtfettsäure war bei 3 Fällen 2,9–3,5%, durchschn. 3,2%; das Gesamtcholesterin bei 3 Fällen 1,3–1,6%, durchschn. 1,4%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 3 Fällen 0,009–0,011%; durchschn. 0,010%, und der Phosphatidphosphor bei 3 Fällen 0,056–0,060%, durchschn. 0,058%.

Tabelle XXIX.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
29	2,9	29	1,3	109	0,009	31	0,060
31	3,5	31	1,3	134	0,011	136	0,058
137	3,1	136	1,6	135	0,011	137	0,056
Mittelwert	3,2	Mittelwert	1,4	Mittelwert	0,010	Mittelwert	0,058

Fettstoffe des Rüchenmarks:

a) Normalgruppe: (Tabelle XXX).

Die Gesamtfettsäure war bei 5 Fällen 7,2–9,3%, durchschn. 8,4%; das Gesamtcholesterin bei 6 Fällen 4,0–4,9%, durchschn. 4,6%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 3 Fällen 0,008–0,013%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 4 Fällen 0,063–0,076%, durchschn. 0,070%.

Tabelle XXX.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
28	9,3	24	4,8	48	0,008	40	0,074
40	8,1	28	4,6	126	0,012	51	0,063
49	9,1	40	4,0	127	0,013	128	0,066
51	8,2	49	4,2	Mittelwert	0,011	129	0,076
129	7,2	51	4,8			Mittelwert	0,070
Mittelwert	8,4	128	4,9				
		Mittelwert	4,6				

b) B_1B_2-Avitaminosegruppe: (Tabelle XXXI).

Die Gesamtfettsäure war bei 4 Fällen 6,6–7,7%, durchschn. 7,2%; das Gesamtcholesterin bei 7 Fällen 3,9–4,8%, durchschn.

4,3%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 5 Fällen 0,010–0,013%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 5 Fällen 0,067–0,081%, durchschn. 0,074%.

Tabelle XXXI.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
33	7,7	11	4,3	34	0,010	11	0,074
54	6,8	16	4,8	45	0,010	16	0,070
55	7,5	25	3,9	122	0,013	123	0,081
62	6,6	33	4,4	124	0,012	132	0,067
		54	4,2	125	0,011	133	0,076
		55	3,9				
		62	4,5				
Mittelwert	7,2	Mittelwert	4,3	Mittelwert	0.011	Mittelwert	0,074

c) B_1-Avitaminosegruppe: (Tabelle XXXII).

Die Gesamtfettsäure war bei 4 Fällen 5,7–7,4%, durchschn. 6,4%; das Gesamtcholesterin bei 5 Fällen 3,9–4,6%, durchschn. 4,4%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 4 Fällen 0,013–0,016%, durchschn. 0.014%; und der Phosphatidphosphor bei 3 Fällen 0,066–0,075%, durchschn. 0,072%.

Tabelle XXXII.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
105	6,7	105	3,9	116	0,013	120	0,075
120	7,4	114	4,6	117	0,013	130	0,075
130	5,7	120	4,6	119	0,016	131	0,066
131	5,8	130	4,2	121	0,014		
		131	4,6				
Mittelwert	6,4	Mittelwert	4,4	Mittelwert	0,014	Mittelwert	0,072

d) Hungergruppe: (Tabelle XXXIII).

Die Gesamtfettsäure war bei 3 Fällen 7,7–8,9%, durchschn. 8,3%; das Gesamtcholesterin bei 3 Fällen 4,4–4,7%, durchschn. 4,5%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 3 Fällen 0,012–0,016%, durchschn. 0,013%; und der Phosphatidphosphor bei . Fällen 0,067–0,085%, durchschn. 0,078%.

Tabelle XXXIII.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
29	8,9	29	4,5	109	0,012	29	0,083
31	8,4	31	4,4	134	0,012	31	0,067
137	7,7	136	4,7	135	0,016	136	0,085
						137	0,078
Mittelwert	8,3	Mittelwert	4,5	Mittelwert	0,013	Mittelwert	0,078

Fettstoffe der Peripherienerven.

a) Normalgruppe: (Tabelle XXXIV).

Die Gesamtfettsäure war bei 5 Fällen 6,0–7,7%, durchschn. 6,9%; das Gesamtcholesterin bei 6 Fällen 3,3–4,6%, durchschn. 3,8%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 3 Fällen 0,009–0,013%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 3 Fällen 0,048–0,057%, durchschn. 0,052%.

Tabelle XXXIV.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
24	7,2	24	3,5	50	0,013	51	0,057
28	6,3	28	3,3	126	0,009	128	0,048
40	7,4	40	4,6	127	0,012	129	0,052
51	7,7	49	4,0				
129	6,0	51	3,7	Mittelwert	0,011	Mittelwert	0,052
		128	3,6				
Mittelwert	6,9	Mittelwert	3,8				

b) *B_1B_2-Avitaminosegruppe:* (*Tabelle XXXV*).

Die Gesamtfettsäure war bei 6 Fällen 5,6–7,5%, durchschn. 6,5%; das Gesamtcholesterin bei 7 Fällen 3,2–4,1%, durchschn. 3,6%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 6 Fällen 0,010–0,012%, durchschn. 0,012%; und der Phosphatidphosphor bei 5 Fällen 0,043–0,054%, durchschn. 0,049%.

Tabelle XXXV.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
16	6,8	11	3,5	32	0,012	11	0,054
25	5,6	16	3,2	34	0,011	16	0,048
33	5,7	25	3,2	113	0,012	112	0,052
54	6,4	33	3,6	122	0,012	123	0,049
55	7,5	54	4,1	124	0,010	133	0,043
62	7,0	55	3,7	125	0,012		
		62	4,0				
Mittelwert	6,5	Mittelwert	3,6	Mittelwert	0,012	Mittelwert	0,049

c) *B_1-Avitaminosegruppe:* (*Tabelle XXXVI*).

Die Gesamtfettsäure war bei 3 Fällen 5,9–6,5%, durchschn. 6,2%; das Gesamtcholesterin bei 5 Fällen 3,4–4,4%, durchschn. 3,9%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 5 Fällen 0,009–0,011%,

Tabelle XXXVI.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
120	6,8	105	4,3	106	0,009	105	0,057
130	5,9	114	4,4	116	0,011	114	0,059
131	6,5	120	3,5	117	0,010	120	0,051
		130	3,4	118	0,010	130	0,042
		131	4,0	119	0,010	131	0,048
Mittelwert	6,2	Mittelwert	3,9	Mittelwert	0,010	Mittelwert	0,051

durchschn. 0,010%; und der Phosphatidphosphor bei 5 Fällen 0,042–0,059%, durchschn. 0,051%.

d) Hungergruppe: (Tabelle XXXVII).

Die Gesamtfettsäure war bei 3 Fällen 6,7–6,8%, durchschn. 6,8%; das Gesamtcholesterin bei 3 Fällen 3,0–4,6%; durchschn. 3,8%; der Aminostickstoff der Fettstoffe bei 5 Fällen 0,009–0,013%, durchschn. 0,011%; und der Phosphatidphosphor bei 3 Fällen-0,037–0,054%, durchschn. 0,047%.

Tabelle XXXVII.

Tiernummer	Gesamtfettsäure %	Tiernummer	Gesamtcholesterin %	Tiernummer	Aminostickstoff der Fettstoffe %	Tiernummer	Phosphatidphosphor %
29	6,8	29	3,8	102	0,009	101	0,049
31	6,7	31	3,0	109	0,009	136	0,054
137	6,8	136	4.6	110	0,013	137	0,037
Mittelwert	6,8	Mittelwert	3,8	134	0,010	Mittelwert	0,047
				135	0,013		
				Mittelw.	0,011		

Zusammenfassende Beobachtung:

Die Resultate der obigen Experimente will ich hier zusammenfassend betrachten.

Da die Fettstoffe im Organismus zueinander in inniger Beziehung stehen, verändert sich im Blut, wenn das Tier eine Umsatzstörung erleidet, nicht nur dasjenige Lipoid, welches direkt Umsatzstörung betrifft, sondern es verändern sich auch andere. Daher muss man bei jeder Untersuchung alle Fettstoffe gleichzeitig beobachten.

Wenn man die bisherigen Berichte von vielen Forschern überblickt, so kann man feststellen, dass sie nur von dem Vergleich des Umsatzes der Fettstoffe bei der Reiskrankheit (B-Avitaminose) und bei normalen Tieren handeln und der Umsatz der Hungergruppe gar nicht berücksichtigt ist, trotzdem bei der Reiskrankheit

(B-Avitaminose) die Tiere aus Appetilosigkeit ins Hungern verfallen und daher ihr Körpergewicht deutlich abnimmt. Es ist also wichtig, dass man auch den Einfluss, den das Hungern auf den Fettumsatz ausübt, und den Fettumsatz der Normalgruppe beobachtet, um den Fettumsatz beim Fehlen von Vitamin B gut zu erforschen.

Mein vorliegender Versuch wurde von obigem Standpunkt aus untersucht.

Fettstoffe des Gehirns (Tabelle XXXVIII).

Der Durchschnittswert der Gesamtfettsäure war bei der Normalgruppe 3,8%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 3,3%, also eine Abnahme von 0,5%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 3,0%, sie zeigte also eine Abnahme von 0,8% und bei der Hungergruppe 3,2%, verglichen mit der Normalgruppe hatte sie also eine Abnahme von 0,6%. Die Abnahme der Gesamtfettsäure bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe kommt also nicht durch Vitaminmangel, sondern wohl durch den Hunger der Tiere, die der B_1-Avitaminosegruppe kommt jedoch nicht nur vom Hungern, sondern auch von der B_1-Avitaminosefütterung.

Der Durchschnittswert des Gesamtcholesterins war bei der Normalgruppe 1,5%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 1,4%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 1,6% und bei der Hungergruppe 1,4%. Hotta (1923) behauptet, dass die Normaltaube 1–1,3%, und die Reistaube 1,2–1,7%, also zeigte die Taube der Reiskrankheit eine Zunahme. Nach Gassner (1927) zeigte die Normaltaube 1,3–1,5% freies und 0,1–0,2% gebundenes, bei der Reistaube 1,3–1,7% freies und 0,1% gebundenes Cholesterin. Nach ihm wiesen also das freie und das gebundene Cholesterin sowohl bei der Reiskrankheit (B-Avitaminose) wie auch beim normalen Tier keinen grossen Unterschied auf. Auch meine Experimente brachten bei der B_1B_2-Avitaminose keinen grossen Unterschied von der Hungergruppe und auch bei der B_1-Avitaminose war keinen Unterschied von der Normalgruppe zu verzeichnen.

In den Nervengeweben war gebundenes Cholesterin nur sehr wenig vorhanden und daher war es schwer mit meiner Bestim-

mungsmethode seine Veränderungen zu bestimmen, deshalb habe ich nur die des Gesamtcholesterins untersucht.

Der Durchschnittswert des Phosphatidphosphors war bei der Normalgruppe 0,059%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 0,052%, bei der Hungergruppe 0,058%; also zeigte sich bei der B_1B_2-Avitaminose, Normal- und Hungergruppe keinen grossen Unterschied, doch die B_1-Avitaminosegruppe zeigte eine Abnahme.

Der Durchschnittswert des Aminostickstoffs der Fettstoffe war bei der Normalgruppe, B_1B_2- und B_1-Avitaminosegruppe 0,011%, bei der Hungergruppe 0,010%; also zeigte sich bei diesen kein grosser Unterschied.

Tabelle XXXVIII.

	Normal	B_1B_2-avitaminotisch	B_1-avitaminotisch	Hunger
Gesamtfettsäure %	3,8	3,3	3,0	3,2
Gesamtcholesterin %	1,5	1,4	1,6	1,4
Phosphatidphosphor %	0,059	0,058	0,052	0,058
Aminostickstoff %	0,011	0,011	0,011	0,010

Die Fettstoffe im Rückenmark (Tabelle XXXIX).

Der Durchschnittswert der Gesamtfettsäure betrug bei der Normalgruppe 8,4%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 7,2%, also war eine Abnahme von 1,2% und bei der B_1-Avitaminosegruppe 6,4%, eine Abnahme von 2% zu verzeichnen. Bei der Hungergruppe betrug der Durchschnittswert 8,3%; und verglichen mit der Normalgruppe zeigte sie keinen grossen Unterschied. Die B_1B_2- und B_1-Avitaminosefütterung ergab eine Abnahme der Gesamtfettsäure, die besonders deutlich bei letzterer Gruppe war.

Der Durchschnittswert des Gesamtcholesterins war bei der Normalgruppe 4,6%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 4,3%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 4,4%, bei der Hungergruppe 4,5%; verglichen mit der Normalgruppe zeigte diese keinen grossen Unterschied. Gassner (1927) behauptet, dass bei der Normaltaube das freie Cholesterin 3,5–4,0%, das gebundene 0,2%, bei der

Reistaube das freie 3,4–4,8%, das gebundene 0,1–0,2% sei; also zeigte das freie Cholesterin Zunahme bei der Reiskrankheit. Bei meinen Experimenten zeigte das Gesamtcholesterin keinen grossen Unterschied bei der B_1B_2- und B_1-Avitaminose, verglichen mit der Normal- und Hungergruppe.

Der Durchschnittswert des Phosphatidphosphors war bei der Normalgruppe 0,070%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 0,074%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 0,072%, bei der Hungergruppe 0,078%, also zeigte sich bei der B_1B_2- und B_1-Avitaminosegruppe und Normalgruppe kein grosser Unterschied derselben, nur leichte Zunahme bei der Hungergruppe.

Der Durchschnittswert des Aminostickstoffs der Fettstoffe war bei der Normalgruppe 0,011%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 0,011%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 0,014%, bei der Hungergruppe 0,013%; also gleichen sich die Normal- und B_1B_2-Avitaminosegruppe, die Hungergruppe und B_1-Avitaminosegruppe zeigen keinen grossen Unterschied.

Tabelle XXXIX.

	Normal	B_1B_2-avitaminotisch	B_1-avitaminotisch	Hunger
Gesamtfettsäure %	8,4	7,2	6,4	8,3
Gesamtcholesterin %	4,6	4,3	4,4	4,5
Phosphatidphosphor %	0,070	0,074	0,072	0,078
Aminostickstoff %	0,011	0,011	0,014	0,013

Die Fettstoffe in den Peripherienerven (Tabelle XL).

Der Durchschnittswert der Gesamtfettsäure war bei der Normalgruppe 6,9%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 6,5%, also eine Abnahme von 0,4%, bei der B_1-Avitaminosegruppe war 6,2%, zeigte also eine Abnahme von 0,7%. Bei der Hungergruppe war 6,8%, verglichen mit der Normalgruppe war kein Unterschied. Dagegen zeigen die B_1B_2 und B_1-Avitaminosegruppe Abnahme, und diese war bei der letzteren besonders deutlich.

Der Durchschnittswert des Gesamtcholesterins war bei der Normalgruppe 3,8%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 3,6%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 3,9%, bei der Hungergruppe 3,8%; also zeigte sich bei diesen kein grosser Unterschied. Gassner (1927) berichtete, dass bei den Flügelnerven der normalen Taube das freie Cholesterin 1,1–1,2%, das gebundene 0,3%, bei der kranken Taube das freie 1,2–2,0%, das gebundene 0,2–0,5% zeigte, doch bei meinen Experimenten zeigte sich bei B_1B_2- und B_1-Avitaminosegruppen kein grosser Unterschied, verglichen mit den Normal- und Hungergruppen.

Tabelle XL.

	Normal	B_1B_2-avitaminotisch	B_1-avitaminotisch	Hunger
Gesatfettsäure %	6,9	6,5	6,2	6,8
Gesamtcholesterin %	3,8	3,6	3,9	3,8
Phosphatidphosphor %	0,052	0,049	0,051	0,047
Aminostickstoff %	0,011	0,012	0,010	0,011

Der Durchschmittswert des Phosphatidphosphors war bei der Normalgruppe 0,052%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe, 0,049%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 0,051%, bei der Hungergruppe 0,047%; also zeigte sich bei diesen kein grosser Unterschied.

Der Durchschmittswert des Aminostickstoffs der Fettstoffe war bei der Normalgruppe 0,011%, bei der B_1B_2-Avitaminosegruppe 0,012%, bei der B_1-Avitaminosegruppe 0,010%, bei der Hungergruppe 0,011%; also zeigte sich bei diesen kein grosser Unterschied.

Wie schon oben erwähnt, nimmt die Gesamtfettsäure in den Nervengeweben bei der B_1B_2- und B_1-Avitaminose im allgemeinen ab, Gesamtcholesterin, Phosphatidphosphor und Aminostickstoff der Fettstoffe zeigen keine deutlichen Veränderungen; dagegen weisst das Neutralfett eine Abnahme auf. Doch diese Abnahme ist bei der B_1-Avitaminose deutlicher als bei der von B_1B_2.

Akiba (1929) hat bei der Reistaube den Umsatz der Zuckerstoffe untersucht und festgestellt, dass im Rückenmark Abnahme

des Glykogens und die Zunahme der Milchsäure hervorgerufen wird.

Die für die Leistungen der Tiere nötige Energie wird von Zuckerstoff und Fett geliefert; doch wenn auf solche Weise die Umsatzstörung des Glykogens auftritt, dient das Fett als Energiequelle. Es ist also etwas Selbstverständliches, wenn, wie bei meinen Experimenten, bei B_1B_2- und B_1-Avitaminose das Neutralfett abnimmt. Das im Gegensatz dazu bei B_1 und B_2-Avitaminose der Umsatz des Cholesterins, Lipoidphosphors und Aminostickstoffs der Fettstoffe in den Nervengeweben keine besonderen Veränderungen erleidt, ist, vom Standpunkt des Wesens der Gewebsfettstoffe aus gesehen, für den Organismus von grosser Bedeutung.

Wenn man diese Tatsachen eingehend beobachtet, und B_1B_2-Avitaminose mit B_1-Avitaminose, also beim Vorhandensein von B_2, vergleicht, ist die Abnahme des Neutralfetts bei letzterem grösser. Das kommt wohl davon, dass Vitamin B_2 auf die Oxydation des Neutralfetts fördernd wirkt, und demnach vermutet man, dass Vitamin B_1 wohl hemmend auf die Oxydation des Fettes wirkt. Das ist eine Tatsache von ausserordentlicher Bedeutung.

Man könnte annehmen, dass die antagonistische Wirkung der Vitamine B_1 und B_2 auf die Oxydation des Neutralfetts auch bei dem Umsatz des Glykogens in Erscheinung tritt.

Dass die Lecithin- und Kephalinmenge der Nervengewebe der Tiere, denen kein Lecithin und Kephalin zugeführt wurde, keine Veränderungen zeigten, kommt wohl daher, dass das durch den Umsatz verbrauchte Lecithin und Kephalin immer durch Synthese aus anderen Bestandteilen ersetzt werden muss.

Schluss

1. Als erste Vorbereitung stellte ich die Fettstoffe im polierten Reis fest. In 500 g poliertem Reis war 1,2 g Gesamtfettsäure und 0,015 g Gesamtcholesterin und in 1 kg konnte ich weder Lecithin noch Kephalin nachweisen.

2. Als zweite Vorbereitung zu diesen Experimenten habe ich die verschiedenen Bestimmungsmethoden der Fettstoffe in den Geweben behandelt. Ich konnte bei 0,2 g Hirngewebe gravimetrisch

9 mg Gesamtfettsäure, bei 0,1 g gravimetrisch 1–2 mg Gesamtcholesterin, bei 0,2 g titrimetrisch 0,05 mg Phosphatidphosphor und bei 0,5 g 0,04–0,08 mg Aminostickstoff der Fettstoffe feststellen.

3. Bei Fütterung mit polierten Reis fehlten ihm ausser den Vitaminen B_1 und B_2, noch Lecithin und Kephalin. Bei vier Gruppen von Tauben, nämlich mit Normalfütterung, ohne Fütter- und B_1-avitaminotische und B_1B_2-avitaminotische Fütterung beobachtete ich die Fettstoffe in den Nervengewebe. Die Resultate sind folgende:

a) Beim Hirn zeigte die Hungergruppe, verglichen mit der Normalgruppe, eine Abnahme der Gesamtfettsäure. Bei der Gruppe, der B_1 und B_2 fehlte, nahm die Gesamtfettsäure ab; doch kam das sicher davon, dass das Tier ins Hungern verfiel, und nicht vom Fehlen des B_1 und B_2. Bei der Gruppe, der B_1 fehlte, war die Abnahme stärker als bei der Hungergruppe. Bei allen Fällen konnte man an der Menge des Gesamtcholesterins, Phosphatidphosphors und Aminostickstoffs der Fettstoffe keine deutlichen Veränderungen bemerken.

b) Am Rückenmark zeigte die Hungergruppe bei allen Fettstoffen, verglichen mit der Normalgruppe, keine grossen Veränderung. Bei der Gruppe, der B_1 und B_2 und bei derjenigen, der B_1 fehlte, zeigte sich eine Abnahme der Gesamtfettsäure; doch war diese bei letzterer deutlicher als bei der ersteren, aber andere Fettstoffe zeigten keine grossen Veränderungen.

c) In den Peripherienerven zeigte die Hungergruppe an allen Fettstoffen, verglichen mit der Normalgruppe, keine grosse Veränderung. Bei der Gruppe, der B_1 und B_2 und derjenigen, der B_1 fehlte, zeigte sich eine Abnahme der Gesamtfettsäure, doch war diese bei der letzteren deutlicher als bei der ersteren.

d) Vitamin B_2 wirkt auf die Oxydation des Fetts in den Nervengeweben fördernd. Vitamin B_1 hemmt dagegen die Oxydation des Fetts in den Nervengeweben. Daher scheint der Umsatz des Fetts im Nervengewebe durch die Kooperation des Vitamins B_1 und B_2 in Gleichgewichtszustand gestellt zu werden.

LITERATUR.

Akiba, R. (1929): Keiô Med. J., **9**, 241.
Axtmayer, J. H. (1930): J. of Nutrition, **2**, 353.
Belfanti, B. (1924): Biochem. Z., **154**, 148.
Bell, R. D. and Doisy, E. A. (1920): J. of Biol. Chem. **44**, 55.
Bloor, W. R. (1929): J. of biol. Chem., **82**, 273.
Chick, H. and Roscoe, M. H. (1929): Biochem. J., **23**, 498.
Degkwitz, R. (1931): Ergebnisse d. Physiol., **32**, 821.
Embden, G. (1921): Z. f. physiol. Chem., **113**, 138.
Endo, M. (1928): J. of Jûzen Med. Soc., **33**, 1892.
Fujimaki, Y. (1928): Report of Imper. Goverm. Instit. for Nutrition, **2**, 171.
Gassner, L. (1927): Biochem. Z., **180**, 359.
Hotta, K. (1923): Z. f. physiol. Chem., **128**, 85.
Ishibashi, M. (1929): The Memoirs of the College of Science Kyoto Imper. Univers., Series A, **12**, 135.
Ishibashi, M. (1933): Zyuryo Bunseki Zikken Sisin, S. 47.
Ito, H. (1926): J. of Osaka Med. Soc., **25**, 69.
Iversen, P. (1920): Biochem. Z., **104**, 22.
Iwata, M. (1930): Bulletin of Instit. of Physic. a. Chem. Research, **9**, 768.
Katsura, S., Hatakeyama, T. und Tajima, K. (1933): Biochem. Z., **257**, 22.
Kumagawa, M. und Suto, K. (1908): Biochem. Z., **8**, 212.
Kura, N. und Kasahara, I. (1928): Mitt. Med. Akad. Kiôto, **2**, 747.
Kura, N. und Mizuno T. (1928): Nihon Byori Gakkai Zasshi, **18**, 180.
Levene, P. A. and Rolf, R. (1924): J. of biol. Chem., **62**, 759.
Naito, H. (1923): Biochem. Z., **142**, 385.
Nakamoto, K. (1925): Modern Medicine, **15**, 311.
Nakamoto, K. und Kasahara, I. (1927): Mitt. med. Akad. Kiôto, **1**, 398.
Nakashima, S. (1932): J. of Jûzen Med. Soc., **37**, 2176.
Neumann, A. (1903): Z. f. physiol. Chem., **37**, 115.
Osato, S. und Heki, M. (1928): J. of Jûzen Med. Soc., **33**, 320.
„ „ „ (1930): J. of biol. Chem., **87**, 541.
Saiki, T. (1931): Report of Imp. Goverm. Instit. for Natrition, **3**, 1.
Sato, Y. (1933): J. of Okayama Med. Soc., **45**, 1021.
Schmitz, E. u. Hiraoka, T. (1928): Biochem. Z., **193**, 1.
Sueyoshi, Y. (1931): J. of Biochem., **13**, 145.
Thudichum, W. (1901): Die Chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

ON THE CYSTINE CONTENT OF HAIR AND FEATHERS.

By

YUZURU OKUDA AND KITARO KATAI.

(From the Biochemical Laboratory of the Department of Agriculture. Kyushu Imperial University, Fukuoka.)

(Received for publication, July 31, 1936)

Takeda (1927), Tadokoro and Ugami (1930) made some investigations on the relation between the cystine content of hair and feather of animals and their age and sex, determining this amino acid by Okuda's Iodine Method (1925), with or without some modification. Lightbody and Lewis (1929), Beadles, Braman and Mitchell(1930), Smuts, Mitchell and Hamilton (1932) studied the relation between the cystine content of the hair of animals and their nutrition.

The present research was carried out in order to determine the cystine content of the hair and the feathers of animals in different conditions.

Method of Determination.

The samples freed from both ether extractive matters and water soluble materials, were used for the determination of cystine. For the determination, the Iodine method was used, titrating with $M/1000$ KIO_3 solution. In many cases, 0.5 g of a sample was hydrolysed with hydrochloric acid and then decolorised and reduced. For the single titration, 20 cc. of 2 per cent hydrochloric acid solution containing about 2 mg cystine was applied, and the end point of the titration was observed by the yellow coloration. But sometimes, samples as small as 0.1 g were hydrolysed, and 10 cc. of 2 per cent hydrochloric acid solution containing about 0.2 mg cystine was titrated electrically. The cystine content described in this communication is shown in per cent of dry matter, unless otherwise indicated.

Cystine Content.

I. The influence of individuality: As the young of the same litter sometimes differ considerably from each other, before the study on the relation between different conditions of animals and the cystine content of their hair is described, attention should be called, first of all, to the influence of the individuality of animals on the cystine content of their hair.

As far as our experiments were concerned, the cystine content of the hair taken from the similar parts of the bodies of albino rats, which were of the same litter, of the same sex, and fed with the same diet, differed from 10.28 per cent to 8.29 in males, and 9.04 to 8.24 in females.

II. The effect of nutrition: Lightbody and Lewis (1929) concluded from their experimental results with albino rats receiving rations containing different amount of casein, that the production of the hair is related to the protein (and cystine) content of the diet. Mitchell etc. (1930, 1932) showed, that a ration deficient in cystine inhibits body growth and the growth of hair, and that the addition of this amino acid to such a ration increases its value in the promotion of hair growth.

In the present experiment we fed two groups of male white rats of the same litter with a vitamin A free diet (extracted casein, 20; starch, 55; cane sugar, 5; agar-agar, 1; boiled and oxidised lard, 15; McCollum salt mixture, 4 and orizanin, 4), with or without addition of the vitamin. In spite of the great difference of the nutritive condition and of the growth of the animals, the average cystine content of their hair were 9.92 and 9.29 respectively. Namely there is no great difference in the cystine content, when the diet contains a sufficient amount of protein (or cystine).

III. The relation of the age: Takeda (1927), Tadokoro and Ugami (1930) showed that the cystine content of human hair varies in ages, high in the old and low in the young. Our experiments, dealing with the hair of animals, such as rats, cows, sheep, pigs and rabbits, of different ages came to an analogous conclusion. Especially interesting were the cases of parent and child, and of

the same animal in different stages of its growth.

Cystine content of the hair of animals of different ages.

a). Different female animals.

Cows (Horstein)		Sheep (Merino)		Sheep (Corridale)		Pigs (Yorkshire)		Pigs (Barkshire)	
Age (Month)		Age (Mon.)		Age (Mon.)		Age (Mon.)		Age (Mon.)	
24	10.42	18	8.74	19	9.67	1	10.76	1	11.75
33	10.04	115	10.13	115	10.36	61	11.49	36	11.94
37	10.58								
62	10.14								
87	11.76								
140	12.52								

b). Parent and child (rabbits, Angora).

Father	15.58	Son (6 months)	11.74
Mother	15.19	Daughter („)	12.10

c). The same animal (rats) in different growing periods.

Age (Month)	2	3	4	7
Male	9.62	10.75	10.99	10.60
Female	10.13	11.23	11.23	11.56

IV. The relation of sex: Takeda, Tadokoro and Ugami studied the relation between the cystine content of the hair of animals and their sex. But their results did not agree.

According to the results of our comparative study performed with the same aged animals, in the great majority of cases, the cystine content of the hair was higher in females than in males.

Cystine content of the hair of animals of the same age and different sex.

	Male	Female	Age (Month)
White rat	10.03	10.10	2
„ „	11.45	12.21	21

	Male	Female	Age (Month)
Sheep (Merino)	8.53	8.74	18
„ (Corridale)	10.14	9.67	19
Rabbit (Belgian)	11.94	12.74	7
„ „	13.18	13.43	36
„ (Angora)	11.74	12.10	6
Ox and cow	12.72	10.42	24

V. The relation of the races: The cystine content of the hair and feathers was determined, with reference to the races of animals, with the following results:—

The relation of the races.

Cow		Sheep		Rabbit		Monkey	
Hamilton	13.05	Marino	9.29	Belgian	12.83	Gibbon	10.18
Holstein	11.12	Shropshire	9.21	Russian	11.72	Sapajon	10.90
Japanese cow	12.14	Corridale	10.06	Angora (France)	12.50	Longtailed monkey	13.22
Hybrid	12.27	Hybrid	8.73	„ (England)	13.65	Japanese monkey	12.63

Monkey		Deer		Bear		Pig	
Black ape	10.80	Japanese deer	8.12	Japanese black bear	13.98	Yorkshire	10.78
Pig-tailed monkey	14.48	Formosan sika	8.58	Brown bear	11.05	Barkshire	11.35
Lemur	13.41	Elk	10.32	Polar bear	11.42		
Lion-tailed monkey	13.39	Sumbar	9.94				

Goat		Raccoon		Wolf		Camel	
Goat	7.43	Raccoon	12.34	Striped hyaena	9.23	Two humped camel	8.74
Angora goat	7.91	Raccoon dog	13.65	Corean wolf	9.63	Rhea	11.54

Kangaroo		Duck (Wing)		Pheasant	
Kangaroo	8.53	Wild duck	9.52	Fheasant	7.78
Rabbit kangaroo	7.96	Baikal teal	9.49	Beeves's pheasant	6.74

As far as the experimental results show, the hair, as a rule, contains much more cystine than the feathers. In the case of hair, that of some monkeies contain as much cystine as the human hair. The hair of rabbits, cows, and bears, also are rich in cystine, but those of sheep, goats and wolves comparatively poor.

VI. Different parts of the body: The cystine content of the hair or feathers, situated in the different parts of the body of an animal, was determined with the following results:—

Cystine content of hair of different parts.

Tiger		Rabbit		Yak		Lion	
Leg	11.05	Back	10.55	Back	8.85	Mane	11.52
Neck	12.67	Leg	11.26	Tail	8.46	Back	16.22
Tail	11.48	Abdomen	10.76				

In the case of birds, the cystine content of the feathers decreases in the order of down feathers (downy), back feathers (scapulars) and wing feathers (primaries), as shown in the following table:—

Cystine content of different kinds of feathers.

	Mandarin duck	White fronted goose	Wild duck	Baikal teal
Down feather	10.75	9.72	10.21	10.16
Back feather	10.43	9.18	10.07	9.98
Wing feather	9.00	7.92	9.52	9.49

	Blackiston's eagle owl	Little grebe	Night heron	Water rail	Woodcock
Back feather	9.29	10.76	10.03	10.00	10.53
Wing feather	8.72	9.94	9.37	9.09	9.75

	Pigeon	Sparrow	Pheasant	Reeves's pheasant	Ostrich	Water-king fisher
Back feather	7.94	9.94	7.69	6.74	7.09	9.16
Wing feather	7.63	9.21	7.78	6.04	6.77	8.81

VII. Different parts of hair: Tadokoro and Ugami (1930), investigating on the human hair, concluded that the cystine content varies with different parts of hair and that of the terminal part is always less than that of the other part. Analogous results were obtained in the present study with horse hairs from the mane and the tail.

Cystine content of different parts of hair.

	Terminal	Middle	Root
Mane	10.24	10.62	10.92
Tail	9.85	9.91	10.65

VIII. Barbs and rhachis of feathers: Takeda (1927) showed that in the cystine content of feathers, barbs are generally superior to rhachis. The present work, dealing with many kinds of birds confirmed this finding. The cystine contents as determined for barbs, rhachis and total feathers are shown in the following table, in which A indicates back feather (scapulars); B, tail feathers; and the rest, wing feathers (primaries), unless otherwise indicated.

Cystine content in barbs and rhachis.

	Swinhol Kalleage	Rosy pelican	Common Guinea fowl	Cockatiel	Lesser sulpher crested cockatoo
Whole feather	7.04	8.26	7.33	7.75	8.34
Barbs	7.72	8.41	8.07	9.13	9.97
Rhachis	6.71	8.15	6.81	6.74	6.88

	Brown owlet	Grey black bird	Curassow	Ostrich	Golden pheasant
Whole feather	8.29	7.12	8.77	7.09 (A)	6.96 (B)
Barbs	9.29	9.29	9.35	6.97	6.78
Rhachis	7.43	6.21	8.26	7.27	7.10

	Reeves's pheasant	Black swan	Magpie	White peafowl
Whole feather	6.04 (B)	8.07	7.04	6.82 (A)
Barbs	6.06	9.61	7.65	6.22
Rhachis	6.02	6.26	6.43	7.06

Summary.

1. The cystine content of hairs and feathers of many kinds of animals was determined by the Iodine Method.

2. Some difference was observed in the cystine content of the hair, even in the albino rats of the same litter, of the same sex, which were fed with the same diet under similar condition.

3. In spite of the great difference of nutritive condition and growth of albino rats, fed with or without addition of vitamin A, the cystine content of their hair showed only a little difference when the diet was rich in protein or cystine.

4. The cystine content in the hair of animals, such as rats, cows, sheep, pigs and rabbits was, as a rule, higher in the old animals than in the young. The same fact was also observed in the cases, of a parent and a child, and of the same animal in different periods of growth.

5. According to the results of experiments performed with animals of the same age, such as rabbits, sheep, rats, cows and oxen, in the majority of cases the cystine content of the hair was higher in females than in males.

6. The relation between the cystine content of the hair and feathers of animals and their races was studied for more than ten species of animals.

7. The cystine contents of hairs and feathers, which are located in the different parts of bodies, were compared for more than twenty species of animals.

8. It was shown, in the case of the horse's mane and tail hairs, that the cystine content of the terminal part is less than that of the other parts.

9. The cystine content varies with different parts of feathers, that of barbs is always more than that of the rhachis.

In conclusion the authers wish to express their thanks to the Masters and Messieurs of the Kyoto Memorial Zoological Garden and the Osaka Municipal Zoological Garden, from where the majority of the materials for the present research were obtained.

REFERENCES.

Beadles, Braman & Mitchell (1930): J. Biol. Chem., **88**, 623.
Lightbody & Lewis (1929): J. Biol. Chem., **82**, 485; **82**, 663.
Okuda (1925): J. Dep't. Agricul., Kyushu Imp. Univ., **1**, 176.
Tadokoro & Ugami (1930, 1932): J. Biochem., **12**, 187; **15**, 257.
Takeda (1927): Nogakubu Gakugeizassi, Kyushu Imp. Univ., **2**, 262.
Smuts, Mitchell & Hamilton (1932): J. Biol. Chem., **95**, 283.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XIX. A note on the Theis and Benedict method when applied to determining free phenols in tissue.

By

KUNIICHI WATANABE.

(*From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.*)

(Received for publication, August 5, 1936)

The present account deals with a preliminary attempt for researches of a β-*N*-acetylglucosaminides attacking glucosidase. To estimate tissue phenols according to the principle of Theis and Benedict (1924), Folin and Wu's deproteinizing reagent is unsuitable and trichloracetic acid method was proved to give accurate results not only in tissue but also in blood analyses.

The writer recommends to make the non-protein filtrate by the following precedures:

Reagents.

1) 7% Trichloracetic acid solution.
2) NaOH solution of such an alkalinity that 1 cc. and 1 drop of it neutralize precisely 5 cc. of 1.)

Procedures:

0.5 to 1 gm. of tissue pulp is made up to 10 cc. with water, shaken with 10 cc. of the trichloracetic acid solution and filtered after standing for 1 hour. 5 cc. of the filtrate are then added to with 0.5 cc. of the reagent 2), diluted to 10 cc. or to their multiple, when necessary, and 10 cc. of the final solution are treated with gum acacia and the phenol reagents as Theis and Benedict described.

Limiting factors in usage of trichloracetic acid and trials with other protein precipitants.

1. pH of the protein-free filtrate must lie in the range be-

tween 6.6 and 7.8, otherwise the colour development is insufficient. The alkalinity of the reagent 2) is so adjusted as to meet this requirement.

2. The readings of the solutions containing from 0.015 to 0.05 mg of phenol are accurately proportional to the 0.025 mg standard as is in the original method.

3. The accompanying table shows that phenol added to the tissue pulp solution or to blood is recovered quantitatively, where the deproteinizing of the latter was made by the following procedures: 1 part of blood was laked in 2 parts of water and, after 10 minutes, added to with 2 parts of 8.75% trichloracetic acid solution and filtered. 10 cc. of the filtrate was then neutralized with 1 cc. of NaOH solution (reagent 2) and 10 cc. of this solution or of the properly diluted were applied to phenol estimation.

tissue or blood	free phenols in 0.5 g tissue or in 2 cc of blood, calc. as phenol. mg	added phenol mg	observed		
			preexisting free phenols + added phenol calc. as phenol. mg	phenol recovered.	
				mg	%
bull liver	0.2098	0.10	0.3098	0.2098	100
		0.20	0.4098	0.2098	100
bull blood	0.044	0.2	0.244	0.200	100
		0.4	0.443	0.399	99.8
		0.8	0.845	0.801	100.1

4. Yellow tune of orange colour deepens along the time after initial colouration of phenol, but, nevertheless, no appreciable change of reading is caused thereby between the 5th to 60th minutes.

5. The criticism of the Folin and Wu's deprotenizing reagent: The non-protein filtrate was obtained by making 1 gm. of liver pulp up to 5 cc. with water, followed by addition of 5 cc. of 10% sodium tungstate and of the equal volume of 2/3 n. H_2SO_4.

As the filtrate became turbid with the diazotized nitroaniline reagent and yielded no colouration on further addition of sodium carbonate, the concentration of the tungstate solution was varied from 10 to 7, 5, 3, and to 1% and the reaction of the filtrate was moved to faint acidity in advance of adding gum acacia. The orange colour could thus be made to appear while the turbidity always accompained it.

6. Fujita and Iwatake's $CdSO_4$ method: The non-protein filtrate was prepared by following the original direction, save that 1 cc. blood was replaced with 1 gm. of tissue pulp (bull liver). The turbidity appeared again in this case in a few minutes after alkalinizing with sodium carbonate and this was not prevented, although the calculated amount of NaOH was used so as to remove the excess of cadmium from the filtrate.

Phenol contents of various bull tissues.

By the present procedures, the following figures were obtained:

Kind of tissue	No.	Free phenols in 100 gm of tissue calc as phenol mg.
Liver	1	24.74
	2	33.15
Heart	1	10.96
	2	9.64
Stomach mucosa	1	20.2
	2	31.84
Kidney	1	21.52
	2	13.94
Thyreoidea	1	9.64
	2	22.00
Small intestine mucosa	1	17.68
	2	13.24
Spleen	1	39.52
	2	30.64
Lung	1	13.00
	2	16.24

Kind of tissue	No.	Free phenols in 100 gm of tissue calc. as phenol mg.	
Gl. submax.	1	29.32	
	2	19.60	
Ovary	1	11.32	
	2	9.52	
Gl. parotis	1	13.12	
	2	13.48	
Cerebrum	1	10.48	
	2	19.12	
Cortex of capsule suprarenalis	1	17.56	
	2	15.52	
Pancreas	1	12.76	
	2	18.16	
Muscle	1	58.72	
	2	170.24	
		by the present procedures:	by the Theis and Benedict method:
Blood.	1	2.41	2.41
	2	2.34	2.31

Muscle contains enormous amount and blood minimal amount of free phenols.

The results obtained on blood by deproteinizing with trichloracetic acid and with tungstate, coincided well with each other.

The writer is indebted to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for defraying the expenses of this work.

REFERENCES.

Theis, R. C. and Benedict, S. R. (1924): Journ. of Biolog. Chem., **61**, 67.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XX. On the Prosthetic Group of Ovomucoid.

By

HAJIME MASAMUNE AND SUSUMU HOSHINO.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo.)

(Received for publication, August 5, 1936)

Levene classified the posthetic group of ovomucoid first with López-Suárez (1916) under a subgroup of mucoitin sulfuric acid, but later regarded it with Mori (1929) as composed of two mannoses and one glucosamine, basing on the figures of elementar analysis of the isolated carbohydrate complex.

In 1931, Zuckerkandl and Messiner-Klebermass (1931) applied their method for glucosamine analysis to this mucoid and from the findings that glucosamine takes up in averages 7.3% and mannose about 10%, they inferred that the half of its total sugar fraction belongs to glucosamine, while the above figures suggest the molecular ratio of them 3 to 4.

According to the more recent investigations of Sörensen (1931) the non-aminosugar moiety involves not merely mannose but one galactose to each three mannoses.

As on one hand, Levene and Mori did not try to analyze the amino- and nonamino-sugars quantitatively and, on the other, the original Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method does not give accurate values (Watanabe 1936) especially on the protein hydrolysate, the present writers undertook a further study in this problem, employing the elaborated method of Masamune and Nagazumi for determination of glucosamine. Special attention was paid also to the assertion of Sörensen.

Experimental.

On the proteid.

Ovomucoid was prepared by the Willianen method modified by Onoe (1936, 1) from this institute and the substance obtained

showed the nitrogen content, rotatory power and amount of glucosamine (10.9%), similar to the Onoe's. The identification of glucosamine was made by isolating it as the tetrabenzoate, by the procedures as from vitellomucoid (Onoe 1936, 2).

As to non-aminosugar, orcinol, indole and diphenylamine I methods yielded the values in Table I (method, Ozaki 1936), which prove that mannose is the sole nonaminosugar existent in it and affords no argument at all to support the view of Sörensen. Trials also failed to isolate galactose as mucic acid from the HCl hydrolysate of the substance.

Table I.

Conc. of ovomucoid solution analysed %	Reaction.	Percentage of mucoid taken up by sugar, calc. as			
		glucose	mannose	galactose	3 mannoses + 1 galactose
0.2	Orcinol	14.5	11.0	9.5	
	Indole	6.5	11.0	9.0	10.8
	Diphenylamin I.	11.0	11.0	17.5	12.3
0.1	Orcinol	13.0	11.0	10.0	
	Indol	7.5	11.0	9.0	10.8
	Diphenylamin I.	15.0	11.0	19.0	12.5

The molecular ratio of glucosamine to mannose in the ovomucoid molecule was thus:

$$\frac{10.9}{179} : \frac{11.0}{180} = 1 : 1.$$

On the isolated prosthetic group.

Because of the fact that what the analytical results demonstrate differ remarkably from the conclusion of Levene and Mori, the prosthetic group was attempted to isolate on the principle of these authors as described below, in order to settle the question

whether or not the carbohydrate fraction in ovomucoid may involve two single complexes, and one of them be lost, or disintegrated by the isolation process.

Preparation of the prosthetic group.

50 gm. of pure ovomucoid were hydrolysed by boiling with 500 cc. of 10% barium hydroxide under reflux for 12 hours and the excess of barium was removed from the cooled and filtered solution by neutralizing the latter with 2 m. H_2SO_4 (23 cc). After being evaporated on the bath to about 400 cc, it was added to, first with saturated lead subacetate solution and next with saturated barium hydroxide, taking, each time, volumes just sufficient to cast down all the precipitable substance (70 cc and 650 cc respectively). The precipitates were then combined, suspended in 80 cc of water and dissolved with 70 cc. of 30% acetic acid and after the insoluble residue was centrifugalized off, the solution was precipitated by addition of 1100 cc. of saturated $Ba(OH)_2$. When above manipulations were repeated again, the mother-liquor showed neither Molish's nor biuret test. After another treatment, the precipitate was again suspended in 150 cc. of water at 50°–55°C and passed with CO_2-gas for 1 hour to set free the carbohydrate complex. The procedure was reiterated until the whole Molish test giving substance was liberated and the combined and to ca. 100 cc. evaporated (in vacuo) extract was shaken with 30 cc. of the Hopkins' reagent. As the supernatant liquor after centrifugalization gave difficultly separable precipitate on passing H_2S-gas, 120 cc. of saturated. $Ba(OH)_2$ solution were added to the mixture without further treatment, and the clear liquor obtained by means of a centrifuge was neutralized with H_2SO_4(2 m.) and filtered. After being concentrated to a small volume under reduced pressure, it was finally poured to 200 cc. of methanol, whereupon the polysaccharide settled out. From the mother liquor, the second fraction was deposited by ether.

Purification was attempted by repetition of the final procedures, but as the most part of the substance came out in a finely dispersed state in methanol, it was deposited by means of a few

small particles of $CaCl_2$.

The product was white powder with brownish tint. Yield, 1.8 gm. It gave no biuret reaction as did Levene and Mori's purified specimen, but ninhydrin, Ehrlich's diazo and Millon's reactions were plainly positive.

Elementar analysis after Pregl.

I. 2.912 mg substance: 4.180 mg CO_2(39.15% C) 1.315 mg H_2O(5.05% H) 0.296 mg ash(10.17%).

II. 3.652 mg substance: 4.537 mg(38.90% C) 1.520 mg H_2O (5.34% H) 0.351 mg ash(11.03%).

III. 2.881 mg substance: 0.112 cc. (14°C 761 mm) N(2.55%).

The ash content was on an average, 10.6% while the final specimen obtained by Levene and Mori was 3.44%. The oxalate test for calcium was positive on the ash, but neither the faintly alkalinized solution nor the acidulated solution of the substance gave precipitate on treatment with CO_2-gas or by addition of $(NH_4)_2SO_4$ respectively. Accordingly, calcium used for purification entered the compound as a constituent of a complex salt.

When the ash content is subtracted, and the amount of the organic elements are calculated out per 100 of the rest, the following values are obtained:

$$39.03 \times \frac{100}{89.4} = 43.7 \text{ C},$$

$$5.20 \times \frac{100}{89.4} = 5.8 \text{ H},$$

$$4.55 \times \frac{100}{89.4} = 5.1 \text{ N}.$$

The comparison of them with those of Levene and Mori's substance, reveals that *N*-content of the present specimen is markedly high, which is decidedly due to the remaining amino acids.

Total reduction.

0.764 mg of the substance dried in vacuo at 78°C was

hydrolysed with 1 n. hydrochloric acid for $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 and 4 hours by the procedures as Onoe (1936, 2) described, and the reduction powers were found to correspond to 36.86, 50.05, 55.64, 59.20 and 58.96%, calculated as glucose at the corresponding durations of hydrolysis. The maximal value is in averages 59.08% glucose.

Glucosamine and mannose contents.

Mannose was estimated by the indole method, and it was found to take up 30.9% of the polysaccharide.

Conc. of the polysaccharide solution taken for analysis %	Conc. of mannose in the solution %	Percentage of polysaccharide occupied by mannose
1.31	0.395	30.2
0.64	0.02	31.25
0.32	0.01	31.25
		30.9 (average)

2.94 mg and 3.0 mg of the polysaccharide contained 0.90 mg (30.6%) and 0.93 mg (31.0%) respectively. Average: 30.8%. The molcular ratio of both sugars is therefore

$$\frac{30.9}{180} : \frac{30.8}{179} = 1 : 1.$$

The power of reduction on ferricyanide of the total sum of these sugars is to match 59.5% glucose by calculation (refer to Onoe 1936, 1), which coincides well with the result attained direct by the reduction method.

Acetyl radicle.

By the modified Postowsky's method, described by Ozaki, 15 mg substance gave 1.04 mg, 1.05 mg and 1.03 mg of the volatile acid, reckoned as CH_3CO. The mean value reaches 6.93%.

The theoretical amount equivalent to glucosamine is

$$30.8 \times \frac{43}{179} = 7.40\%.,$$

namely, 93.6% of the amino radical of glucosamine is acetylated.

The above figures, although the specimen is not yet free from aminoacids, lead to the conclusion that, by the process of isolation, the relationship between mannose and acetylglucosamine is not altered and the carbohydrate fraction of the mucoid involves nothing but one single complex.

Conclusion.

The prosthetic group of ovomucoid is composed of equimolecular mannose and acetylglucosamine.

The elementar analysis was made kindly by Dr. S. Umezawa, Assistant of Professor H. Suginome in the Chemical Institute. The writer is further indebted to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant towards the expenses of this research.

REFERENCES.

Levene, P. A. and Mori, T. (1926): Journ. of Biol. Chem., **84**, 50.

Masamune, H. and Nagazumi, Y. (will be published shortly) Journ. of Biochem.

Onoe, T. (1936, 1): Journ. of Biochem., **24**, 1.

„ (1936, 2): Journ. of Biochem., **24**, 9.

Ozaki, G. (1936): Journ. of Biochem., **24**, 73.

Sörensen, M. (1934): Biochem. Zeits., **269**, 271.

Zuckerkandl, F. and Messiner-Klebermass, L. (1931): Biochem. Zeits., 236, 19.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DES SOGENANNTEN GEBUNDENEN BLUTZUCKERS.

III. Mitteilung

Über den Einfluss der Pankreas- und Nebennierenfunktion auf den sogenannten gebundenen Blutzucker.

Von

YOSHIMASA MATSUOKA.

(*Aus der med. Universitätsklinik von Prof. N. Kageura, Nagasaki, Japan.*)

(Eingegangen am 7. August 1936)

Unter normalen Verhältnissen hat das Tier einen bestimmten freien Blutzuckergehalt und bemüht sich, diesen beständig zu erhalten. Bei dieser Regulierung des Blutzuckers spielen die inneren Sekretionsorgane—nämlich Pankreas, Schilddrüse, Nebenniere und Hypophyse—eine grosse Rolle. Vor allem steht das Pankreas in engster Beziehung zu dem freien Blutzuckerspiegel.

A. Über den Einfluss der Pankreasfunktion auf den sog. geb. Blutzucker.

I. Der Einfluss des Insulins.

Obwohl eine Anzahl von Forschern (Nitzescu u. Popescu-Inotesti(1923), Bierry, Rathery u. Kourilsky(1924), Scott u. Best (1924), Condorelli (1925), Caltaviano u. Liotta (1929), Camidge (1923), Iketani (1927), Kamada (1929), Imanishi (1929) u.s.w.) angeben, dass, je nachdem der freie Blutzucker unter Einfluss von Insulin absinkt, der sog. geb. Blutzucker mehr oder weniger ansteigt, haben einige andere Autoren (Simonnet u. Mme. Randoin (1924), Mc. Cormick et Macleoid(1923), Staub(1925), Grevenstuk(1929), Toscano (1927) u.s.w.) im Gegenteil gerade eine Senkung auch des sog. geb. Blutzuckers gefunden. Die rumänischen Forscher Nitzescu und Popescu-Inotesti (1923) glaubten feststellen zu können, dass

nach Einspritzung von Insulin bei narkotisierten Hunden der sog. geb. Blutzucker anstieg bis zu einem Maximum, das nach 3½–4 Stunden erreicht wurde, gleichzeitig mit dem Minimum des freien Blutzuckers, worauf der sog. geb. Blutzucker schnell wieder absank, sogar bis zu subnormalen Werten. Doch wog dabei die Zunahme des sog. geb. Blutzuckers, als Glucose berechnet, nie vollständig die Abnahme des freien Blutzuckers auf. Weiter hat Condorelli (1924–5) eine grosse Anzahl von Versuchen ausgeführt an 24 Stunden hungernden kleinen Kaninchen. In 19 von 20 Versuchen war während der Insulinhypoglykämie, ungeachtet des Auftretens oder Fehlens von Krämpfen, der sog. geb. Blutzucker absolut stark angestiegen. Die Dosis des Hormons betrug dabei 1–10 der 1923 gebräuchlichen Einheiten: die Bestimmung geschah 1 bis 3 Stunden nach der Einspritzung. Auch kleinere Dosen von 0,2 Einheit bewirkten noch gleiche Steigerung des sog. geb. Blutzuckers.

Andererseits gibt Grevenstuk (1929), der die Senkung des sog. geb. Blutzuckers unter Insulineinfluss behauptet, in seiner Veröffentlichung an, dass die Ursache für solchen Gegensatz der Befunde bei Insulinverabreichung vielleicht in der Wahl des Versuchstieres, in der Reinheit des verwendeten Insulinpräparates oder in kleinen Differenzen der Bestimmungsmethode des sog. geb. Blutzuckers steckt. Aber es besteht noch eine Möglichkeit, nämlich dass das Pankreas neben dem Insulin, das auf den sog. geb. Blutzucker regulierend wirkt, noch ein anderes Hormon enthalte, das den sog. geb. Blutzucker senken könnten.

In meiner vorangehenden Arbeit habe ich meine Ansicht über das Verhalten des sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr bei Eiweiss-Fettnahrung mitgeteilt. Die Fragen nach dem Einfluss der Menge des eingespritzten Insulins und dem der Eiweiss-Fettnahrung auf den Spiegel des sog. geb. Blutzuckers nach Insulinverabreichung und ferner, ob die durch Eiweiss-Fettdiät oder Hunger hervorgerufenen Änderungen des sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr durch Einspritzung von Insulin unterdrückt werden, sind Aufgaben dieser Untersuchung.

Um die erste dieser Fragen zu klären, wurden den Tieren nach 24 stündigem Fasten verschiedene Einheiten Insulin (von kleinen

Menge bis zu Krampfdosis) jeden 3. oder 4. Tag subcutan verabreicht und danach der Gehalt des freien sowie des sog. geb. Blutzuckers gleichzeitig 6 Stunden lang (1St. 2.5St. 4St. 6St.) vergleichend untersucht. Während dieser Untersuchung wurden die Tiere natürlich mit kohlenhydratreicher gemischter Nahrung genährt. Zur Blutentnahme und Bestimmung des freien und des sog. geb. Blutzuckers wurden genau dieselben Methoden, wie sie in meiner vorangehenden Mitteilung beschrieben sind, benutzt.

Die Versuchsresultate an vier Hunden, die mit kohlenhydratreicher gemischter Nahrung genährt und mit 1/4–2 Einheiten Insulin pro kg. nacheinander zunehmend subcutan injiziert wurden, seien hier übersichtlich in Tabellenform mitgeteilt.

Tabelle I.

Nr. des Hundes	Datum	Körpergewicht	Menge des eingesp. Insulins (pro kg)	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%)				
					Vor der Insulineinsprit.	1 St. n.d Insulineinsprit.	2½ St.	4 St.	6 St.
		kg.	Eh.						
Nr. 17	27/XII	9,0	1/4	Fr. Z.	0,082	0,053	0,064	0,087	0,082
				Geb. Z.	0,086	0,088	0,085	0,085	0,095
	30/ „	8,9	1/2	Fr. Z.	0,078	0,046	0,040	0,058	0,083
				Geb. Z.	0,081	0,087	0,089	0,082	0,084
	4/I	9,2	1	Fr. Z.	0,081	0,058	0,034	0,047	0,074
				Geb. Z.	0,091	0,075	0,096	0,082	0,106
	8/I	9,3	2	Fr. Z.	0,091	0,042	0,039	0,044	0,091
				Geb. Z.	0,081	0,079	0,081	0,084	0,063
Nr. 18	27/XII	9,0	1/4	Fr. Z.	0,094	0,079	0,060	0,083	0,079
				Geb. Z.	0,097	0,112	0,113	0,117	0,110
	30/ „	8,8	1/2	Fr. Z.	0,105	0,053	0,055	0,091	0,089
				Geb. Z.	0,113	0,107	0,107	0,101	0,118
	4/I	8,8	1	Fr. Z.	0,104	0,044	0,039	0,034	0,066
				Geb. Z.	0,106	0,109	0,110	0,105	0,110
	8/I	8,7	2	Fr. Z.	0,096	0,038	0,035	0,022	Krampf
				Geb. Z.	0,118	0,130	0,125	0,125	
Nr. 19	6/I	12,7	1/4	Fr. Z.	0,089	0,047	0,049	0,074	0,085
				Geb. Z.	0,114	0,111	0,114	0,114	0,111
	11/I	13,1	1/2	Fr. Z.	0,081	0,054	0,038	0,049	0,092
				Geb. Z.	0,100	0,097	0,093	0,091	0,108
	16/I	12,4	I	Fr. Z.	0,083	0,049	0,040	0,033	0,040
				Geb. Z.	0,108	0,100	0,110	0,105	0,103

Nr. 20	6/I	7,8	1/4	Fr. Z.	0,087	0,047	0,058	0,071	0,078
				Geb. Z.	0,126	0,138	0,128	0,116	0,122
	11/I	8,0	1/2	Fr. Z.	0,085	0,047	0,038	0,067	0,088
				Geb. Z.	0,108	0,111	0,108	0,107	0,103
	16/I	7,7	1	Fr. Z.	0,074	0,033	0,026	0,037	0,060
				Geb. Z.	0,119	0,112	0,115	0,111	0,112
	20/I	7,5	2	Fr. Z.	0,080	0,037	0,031	0,029	0,029
				Geb. Z.	0,101	0,110	0,110	0,111	0,104

Der Wert des freien Blutzuckers sinkt durch Insulinverabreichung bedeutend ab, und je grösser die Menge des eingespritzten Insulins, desto stärker und länger dauernd tritt die Senkung des freien Blutzuckers in Erscheinung. Dabei scheint der Wert des sog. geb. Blutzuckers nach Insulinverabreichung bald höher als zuvor, bald nahezu unverändert zu sein, aber er wird durch die Veränderung der Insulindosis nicht bedeutend beeinflusst. Die geringfügigen Abweichungen meiner Resultate von denen der genannten Forscher liegen vielleicht an kleinen Verschiedenheiten der Versuchsanordnung.

Bei dem zweiten Versuche wurden die Tiere eine bestimmte Zahl von Tagen zuerst mit kohlenhydratreicher gemischter Nahrung, dann mit Eiweiss-Fettdiät, und zuletzt mit Kohlenhydratzusatz zur Grundkost, wie in meiner I. Mitteilung erwähnt, genährt, und in jeder Periode eine bestimmte Einheit Insulin nach 24 stündigem Fasten subcutan eingespritzt und danach der Wert des freien sowie des sog. geb. Blutzuckers gleichzeitig stündlich 3 Stunden lang vergleichend untersucht.

Tabelle II.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des eingesp. Insulins (pro kg)	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%)			
						Vor der Insulineinsp.	1St. n.d. Insulineinsp.	2St.	3St.
Nr. 21	Gewöhnliche Kost	14/IV	kg. 10.5	Eh.	Fr. Z.	0,091	0,048	0,053	0,088
					Geb. Z.	0,085	0,094	0,102	0,077
	Eiweiss-Fettdiät	18/ „	10,0	1/4	Fr. Z.	0,088	0,046	0,056	0,078
					Geb. Z.	0,104	0,126	0,101	0,105
	Kohlenhydratzusatz	22/ „	10.3		Fr. Z.	0,100	0,058	0,062	0,096
					Geb. Z.	0,099	0,109	0,112	0,100

Nr. 22	Gewöhnliche Kost	14/IV	9,7	1/4	Fr. Z.	0,098	0,058	0,069	0,087
					Geb. Z.	0,104	0,121	0,124	0,104
	Eiweiss-Fettdiät	18/ „	9,5		Fr. Z.	0,096	0,056	0,076	0,090
					Geb. Z.	0,106	0,128	0,109	0,094
	Kohlen-hydratzusatz	22/ „	9,3		Fr. Z.	0,100	0,065	0,092	0,091
					Geb. Z.	0,106	0,118	0,110	0,105
Nr. 23	Gewöhnliche Kost	13/V	5,6	1/2	Fr. Z.	0,072	0,040	0,052	0,092
					Geb. Z.	0,126	0,140	0,135	0,122
	Eiweiss-Fetthiät	17/ „	5,5		Fr. Z.	0,083	0,036	0,043	0,047
					Geb. Z.	0,100	0,114	0,106	0,102
	Kohlen-hydratzusatz	22/ „	5,9		Fr. Z.	0,103	0,038	0,043	0,085
					Geb. Z.	0,125	0,150	0,140	0,138
Nr. 24	Gewöhnliche Kost	11/VI	8,6	1/4	Fr. Z.	0,101	0,070	0,057	0,095
					Geb. Z,	0,126	0,130	0,141	0,128
	Eiweiss-Fettdiät	17/ „	8,4		Fr. Z.	0,105	0,072	0,074	0,106
					Geb. Z.	0,105	0,115	0,109	0,109
	Kohlen-hydratzusatz	22/ „	8,9		Fr. Z.	0,092	0,058	0,059	0,081
					Geb. Z.	0,126	0,133	0,132	0,127
Nr. 25	Gewöhnliche Kost	7/VI	9,3	1/2	Fr. Z.	0,105	0,067	0,047	0,045
					Geb. Z.	0,078	0,068	0,087	0,082
	Eiweiss-Fettdiät	12/ „	9,1		Fr. Z.	0,088	0,048	0,039	0,039
					Geb. Z.	0,114	0,111	0,107	0,110
	Kohlen-hydratzusatz	18/ „	9,9		Fr. Z.	0,110	0,043	0,086	0,065
					Geb. Z.	0,122	0,117	0,117	0,110
Nr. 26	Gewöhnliche Kost	7/VI	8,3	1/2	Fr. Z.	0,098	0,047	0,045	0,049
					Geb. Z.	0,128	0,120	0,129	0,125
	Eiweiss-Fettdiät	12/ „	8,4		Fr. Z.	0,099	0,050	0.045	0,056
					Geb. Z.	0,149	0,144	0,138	0,144
	Kohlen-hydratzusatz	18/ „	8,9		Fr. Z.	0,101	0,058	0,047	0,051
					Geb. Z.	0,142	0,137	0,134	0,136
Nr. 27	Gewöhnliche Kost	11/VI	11,0	1/2	Fr. Z.	0,099	0,054	0,052	0,047
					Geb. Z.	0,109	0,107	0,102	0,107
	Eiweiss-Fettdiät	17/ „	10,4		Fr. Z.	0,090	0,072	0,065	0,047
					Geb. Z.	0,094	0,102	0,094	0,093
	Kohlen-hydratzuatzs	22/ „	11,2		Fr. Z.	0,110	0,065	0,054	0,041
					Geb. Z.	0,089	0,092	0,085	0,089

Wie die Tabelle II. zeigt, wird weder die Senkung des freien noch die Steigerung des sog. geb. Blutzuckers durch Wechsel der Ernährungsweise beeinflusst.

In dem dritten Versuche wurde bei den Tieren die Periode der kohlenhydratreichen gemischten Nahrung und die der Eiweiss-

Fettdiät jeden 3–4 Tage gewechselt, und die dabei eingetretenen alimentären Veränderungen am freien wie auch am sog. geb. Blutzucker sowie die, die bei Eiweiss-Fettdiät unter Insulineinfluss auftreten, vergleichend beobachtet.

Wie aus Tabelle III. ersichtlich ist, kommt die Hyperglykämie nach Zuckerzufuhr und die alimentäre Senkung des sog. geb. Blutzuckers durch Eiweiss-Fettdiät auffallend stärker als bei gemischter

Tabelle III.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des Tr. Zuckers	Menge des eingesp. Insulins	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) Vor der Zuckerzufuhr	1St. n. d. Zuckerzufuhr	2St.	3St.
			kg.	g.	Eh. pro kg					
Nr. 28	Gewöhnliche Kost	18/X	9,1	45		Fr. Z.	0,077	0,100	0,105	0,055
						Geb. Z.	0,128	0,129	0,134	0,128
	Eiweiss-Fettdiät	22/ „	9,1		1/4	Er. Z.	0,089	0,216	0,177	0,079
						Geb. Z.	0,132	0,135	0,132	0,139
	Gewöhnliche Kost	26/ „	9,2			Fr. Z.		0,123	0,105	0,073
						Geb. Z.		0,143	0,145	0,132
	Eiweiss-Fettdiät	30/ „	9,3			Fr. Z.	0,098	0,212	0,212	0,137
						Geb. Z.	0,119	0,099	0,097	0,119
	Gewöhnliche Kost	2/XI	9,1			Fr. Z.	0,096	0,125	0,129	0,056
						Geb. Z.	0,134	0,124	0,121	0,134
	Eiweiss-Fettdiät	6/ „	9,4		1/2	Fr. Z.	0,094	0,204	0,167	0,055
						Geb. Z.	0,118	0,107	0,125	0,105
Nr. 29	Gewöhnliche Kost	19/XI	11,0	50		Fr. Z.	0,087	0,100	0,105	0,087
						Geb. Z.	0,118	0,114	0,120	0,109
	Eiweiss-Fettdiät	23/ „	11,6			Fr. Z.	0,075	0,211	0,204	0,169
						Geb. Z.	0,137	0,124	0,124	0,134
	Gewöhnliche Kost	27/ „	11,4			Fr. Z.	0,096	0,119	0,104	0,076
						Geb. Z.	0,112	0,115	0,113	0,122
	Eiweiss-Fettdiät	2/XI	11,5		1/2	Fr. Z.	0,087	0,117	0,103	0,062
						Geb. Z.	0,113	0,122	0,116	0,121
Nr. 30	Gewöhnliche Kost	19/XI	10,0	50		Fr. Z.	0,084	0,126	0.062	0,078
						Geb. Z.	0,129	0,127	0,130	0,123
	Eiweiss-Fettdiät	23/ „	9,7			Fr. Z.	0,102	0,238	0,238	0,121
						Geb. Z.	0,148	0,135	0.135	0,137
	Gewöhnliche Kost	26/ „	9,2			Fr. Z.	0,103	0,123	0,093	0,080
						Geb. Z.	0,124	0,128	0,129	0,131
	Eiweiss-Fettdiät	2/ „	9,2		1/2	Fr. Z.	0,094	0,126	0,114	0,062
						Geb. Z.	0,123	0,115	0,113	0,121

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des Tr. Zuckers	Menge des eingesp. Insulins	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) Vor der Zuckerzufuhr	1 St. n. d. Zuckerzufuhr	2 St.	3 St.
			kg.	g.	Eh. pro kg					
Nr. 31	Gewöhnliche Kost	8/XII	8,2	40		Fr. Z.	0,094	0,136	0,124	0,079
						Geb. Z.	0,097	0,101	0,102	0,103
	Eiweiss-Fettdiät	12/ „	8,0			Fr. Z.	0,089	0,201	0,154	0,108
						Geb. Z.	0,123	0,097	0,114	0,130
	Gewöhnliche Kost	17/ „	8,1			Fr. Z.	0,080	0,105	0,087	0,070
						Geb. Z.	0,126	0,123	0,134	0,131
	Eiweiss-Fettdiät	23/ „	7,9		1/4	Fr. Z.	0,072	0,183	0,147	0,140
						Geb. Z.	0,114	0,115	0,131	0,113
Nr. 32	Gewöhnliche Kost	8/XII	7,6	35		Fr. Z.	0,076	0,120	0,110	0,070
						Geb. Z.	0,116	0,117	0,113	0,119
	Eiweiss-Fettdiät	12/ „	7,4			Fr. Z.	0,083	0,220	0,147	0,098
						Geb. Z.	0,100	0,088	0,106	0,097
	Gewöhnliche Kost	17/ „	7,5			Fr. Z.	0,078	0,113	0,069	0,070
						Geb. Z.	0,096	0,104	0,109	0,104
	Eiweiss-Fettdiät	23/ „	7,4		1/4	Fr. Z.	0,081	0,140	0,101	0,056
						Geb. Z.	0,112	0,101	0,115	0,101
Nr. 33	Gewöhnliche Kost	9/I	10,2	40		Fr. Z.	0,085	0,106	0,108	0,067
						Geb. Z.	0,130	0,135	0,123	0,133
	Eiweiss-Fettdiät	13/ „	10,2		1/4	Fr. Z.	0,094	0,099	0,106	0,095
						Geb. Z.	0,133	0,143	0,128	0,136
	Gewöhnliche Kost	17/ „	10,0			Fr. Z.	0,094	0,101	0,097	0,088
						Geb. Z.	0,126	0,136	0,125	0,134
	Eiweiss-Fettdiät	21/ „	10,2			Fr. Z.	0,085	0,177	0,165	0,108
						Geb. Z.	0,117	0,094	0,092	0,116
Nr. 34	Gewöhnliche Kost	9/I	11,0	40		Fr. Z.	0,085	0,099	0,096	0,072
						Geb. Z.	0,144	0,126	0,126	0,130
	Eiweiss-Fettdiät	13/ „	11,2		1/4	Fr. Z.	0,113	0,124	0,120	0,108
						Geb. Z.	0,117	0,139	0,115	0,115
	Gewöhnliche Kost	17/ „	10,5			Fr. Z.	0,085	0,103	0,081	0,077
						Geb. Z.	0,119	0,111	0,127	0,111
	Eiweiss-Fettdiät	21/ „	10,5			Fr. Z.	0,076	0,283	0,199	0,086
						Geb. Z.	0,118	0,085	0,098	0,116

Nahrung zum Ausdruck. Aber in meinem kombinierten Versuch, bei dem bei Eiweiss-Fettdiät eine geringe Menge von Insulin zugleich mit peroraler Zuckerzufuhr eingespritzt wird, wird nicht nur die durch die Eiweiss-Fettdiät verursachte Hyperglykämie nach Zuckerzufuhr, sondern auch die dadurch herbeigeführte

alimentäre Senkung des sog. geb. Blutzuckers in der Mehrzahl der Fälle unter dem Einfluss des Insulins vollkommen beseitigt.

In dem letzten Versuche wurde bei den Tieren die Periode der gemischten Nahrung (2 Wochen andauernd) und des einwöchigen Hungers nacheinander angewandt. Und wie die durch Hunger verursachte alimentäre Steigerung des freien und des sog. geb. Blutzuckers durch Insulinverabreichung beeinflusst wird, wurde an drei Hunden beobachtet.

Tabelle IV.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des Tr. Zuckers	Insulininjection (Einheit)	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) Vor der Zuckerzufuhr	1St. n. d. Zuckerzufuhr	2St.	3St.
			kg.	g.						
Nr. 35	Gewöhnliche Kost	13/IV	8,8	40	(—)	Fr. Z.	0,098	0,112	0,116	0,075
						Geb. Z.	0,097	0,097	0,106	0,102
	Seit 13/4 Hunger	20/ „	7,5	40	(5)	Fr. Z.	0,093	0,148	0,147	0,156
						Geb. Z.	0,096	0,109	0,106	0,108
	Gewöhnliche Kost	4/V	8,2	40	(—)	Fr. Z.	0,092	0,100	0,110	0,059
						Geb. Z.	0,110	0,110	0,115	0,118
	Seit 5/5 Hunger	12/ „	7,0	40	(—)	Fr. Z.	0,092	0,207	0,194	0,077
						Geb. Z.	0,103	0,118	0,107	0,117
Nr. 36	Gewöhnliche Kost	13/IV	9,4	40	(—)	Fr. Z.	0.095	0,118	0,082	0,086
						Geb. Z.	0,106	0,109	0,113	0,112
	Seit 13/4 Hunger	20/ „	8,2	40	(5)	Fr. Z.	0,082	0,179	0,160	0,058
						Geb. Z.	0,105	0,117	0,118	0,117
	Gewöhnliche Kost	4/V	8,3	40	(—)	Fr. Z.	0,084	0,095	0,059	0,072
						Geb. Z.	0,127	0,131	0,128	0,120
	Seit 4/5 Hunger	11/ „	7,2	40	(—)	Fr. Z.	0,052	0,220	0,243	0,220
						Geb. Z.	0,124	0,157	0,164	0,159
Nr. 37	Gewöhnliche Kost	5/V	6,7	35	(—)	Fr. Z.	0,081	0,109	0,094	0,072
						Geb. Z.	0,104	0,105	0,102	0,104
	Seit 6/5 Hunger	12/ „	6,0	35	(—)	Fr. Z.	0,100	0,228	0,285	0,281
						Geb. Z.	0,118	0,146	0,156	0,164
	Gewöhnliche Kost	28/ „	6,3	35	(—)	Fr. Z.	0,099	0,130	0,127	0,107
						Geb. Z.	0,120	0,123	0,128	0,122
	Seit 28/5 Hunger	3/VI	5,8	35	(3)	Fr. Z.	0,099	0,148	0,102	0,081
						Geb. Z.	0,133	0,160	0,153	0,140

Wie die Tabelle IV. zeigt, wird die durch Hunger verstärkte alimentäre Steigerung des freien Blutzuckers durch Insulineinsprit-

zung fast vollkommen beseitigt. Der Gehalt des sog. geb. Blutzuckers stellte sich dabei zwischen dem bei gemischter Nahrung und bei Hunger entgegen meiner Erwartung, dass er die Summe seiner Steigerung bei Hunger und bei Insulinverabreichung zeigen würde. Mit anderen Worten wird nicht nur die durch Hunger verursachte Hyperglykämie nach Zuckerfuhr, sondern auch die dadurch hervorgerufene alimentäre Steigerung des sog. geb. Blutzuckers durch Insulinverabreichung bis zum gewissen Grade unterdrückt.

II. Der Einfluss der Pankreasexstirpation.

Krebs und Munk (1864) scheinen die ersten gewesen zu sein, welche die Entfernung der Bauchspeicheldrüse und Unterbindung der Gänge der Bauchspeicheldrüse ausgeführt haben, in der Absicht, Aufklärung über die Beziehung zwischen Pankreas und Zuckerkrankheit zu erhalten, übrigens mit negativem Ergebnis. Fast zu gleicher Zeit berichteten De Dominicis sowie von Mering und Minkowski (1889), dass die Entfernung des Pankreas bei Hunden zur Glykosurie führt, weil der Ausfall des Pankreas den Verbrauch des Zuckers im Organismus beeinträchtigt.

Bierry, Rathery, Gournay und Kourilsky (1924) geben an, dass partielle Exstirpation des Pankreas zu keiner nennenswerten Änderung des Gehaltes des sog. geb. Blutzuckers führt, aber nach Totalexstirpation nicht nur der freie Blutzucker ansteigt, sondern auch der sog. geb. Blutzucker; die Stärke dieser Erhöhung sei aber individuell ausserordentlich wechselnd. Nitzescu und Popescu-Inotesti (1924) fanden auch bei vollkommen pankreaslosen Hunden nach 24 stündigem Fasten immer eine Steigerung des sog. geb. Blutzuckers über die Norm, obwohl die Werte unterhalb derer des freien Blutzuckers blieben. Demgegenüber sah Condorelli (1924) in einem Fall von Totalexstirpation des Pankreas mit Abbinden der Arteria pankreaticoduodenalis den sog. geb. Blutzucker auf Null absinken; in anderen Fällen, wo diese Arterie unbeeinträchtigt blieb, oder das Pankreas nur teilweise entfernt wurde, blieb der sog. geb. Blutzucker nahezu unverändert. Weil in den zahlreichen Arbeiten auf diesem Gebiete, wie gesagt,

keine Einigkeit herrscht, kam mir der Gedanke, die Änderung des Gehaltes des sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr bei partieller (über zwei Drittel) oder totaler Exstirpation des Pankreas stündlich 3 Stunden lang vergleichend zu beobachten.

Tabelle V.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des Tr. Zuckers	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%)			
						Vor der Zuckerzufuhr	1St.n.d. Zuckerzufuhr	2St.	3St.
			kg.	g.					
Nr. 38	Vor der Operation	14/XI	10,5	45	Fr. Z.	0,100	0,123	0,079	0,083
					Geb. Z.	0,121	0,123	0,127	0,123
	Nach der Operation	26/ „	9,4		Fr. Z.	0,098	0,156	0,136	0,095
					Geb. Z.	0,155	0,165	0,155	0,140
		14/ „	9,2		Fr. Z.	0,117	0,168	0,158	0,145
					Geb. Z.	0,121	0,112	0,110	0,113
Nr. 39	Vor der Operation	21/XI	9,3	40	Fr. Z.	0,103	0,133	0,129	0,096
					Geb. Z.	0,116	0,109	0,109	0,118
	Nach der Operation	28/ „	8,8		Fr. Z.	0,121	0,152	0,165	0,125
					Geb. Z.	0,114	0,106	0,106	0,111
		4/ „	8,5		Fr. Z.	0,114	0,139	0,145	0,103
					Geb. Z.	0,110	0,096	0,099	0,112
Nr. 40	Vor der Operation	2/V	7,7	35	Fr. Z.	0,105	0,134	0,131	0,110
					Geb. Z.	0,102	0,099	0,105	0,102
	Nach der Operation	9/ „	7,2		Fr. Z.	0,096	0,192	0,169	0,085
					Geb. Z.	0,135	0,125	0,128	0,120
		15/ „	7,0		Fr. Z.	0,086	0,170	0,134	0,064
					Geb. Z.	0,099	0,120	0,110	0,107

Wenn das Pankreas teilweise (über zwei Drittel) entfernt wird, lebt der Hund lange wie normal weiter, und bleibt der Nüchternwert des freien Blutzuckers nahezu unverändert und tritt kein Zucker im Harn auf. Der Nüchternwert des sog. geb. Blutzuckers zeigt dabei bald eine Steigerung, um sich sogar im Laufe der Zeit wiederherzustellen, bald bleibt er nahezu unverändert. Durch diese Operation wird die Steigerung des freien Blutzuckers nach Zuckerzufuhr etwas stärker als zuvor, aber der Wert des sog. geb. Blutzuckers wird nach Zuckerzufuhr nicht bedeutend beeinflusst.

Tabelle VI.

Nr. des Hundes	Körper-gewicht	Blutzuckergehalt (%)						
		Vor der Operation			Nach der Operation			Datum der Operation
		Datum	Fr. Z.	Geb. Z.	Datum	Fr. Z.	Geb. Z.	
Nr. 41	8,1kg,	10/XII	0,086	0,119	19/XII	0,312	0,182	16/12
Nr. 42	11,4	14/ „	0,087	0,109	21/ „	0,406	0,218	17/12
Nr. 43	8,5	18/III	0,086	0,102	23/III	0,180	0,168	19/3
Nr. 44	8,4	23/ „	0,091	0,113	28/ „	0,332	0,230	23/3
Nr. 45	10,2	23/ „	0,089	0,124	28/ „	0,336	0,208	24/3

Nach Totalexstirpation der Drüse steigt nicht nur der freie Blutzucker an, sondern auch der sog. geb. Blutzucker und kommt eine Glykosurie viel leichter zum Vorschein. Aber der Hund wird dabei mutlos und appetitlos; zwar nimmt er Nahrung auf, aber er erbricht sie sofort wieder. Daher magert das Tier von Tag zu Tag ab und geht schlieslich innerhalb einer Woche zugrunde. Obgleich dem Tier, bei dem das Pankreas vollkommen entfernt worden war, die Zuckerlösung durch Sonde eingeführt wurde, erbrach es sich und deshalb konnte ich die Veränderung des freien sowie sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr nicht beobachten. Die Ursache davon steckt meines Erachtens vielleicht in Circulationsstörung bzw. Passagestörung der Gebiete der Arteria pankreaticoduodenalis, weil diese Arterie trotz grosser Vorsicht bei Pankreatektomie mehr oder weniger geschädigt wird. Meine oben beschriebenen Ergebnisse, dass bei pankreaslosen Hunden der sog. geb. Blutzucker stark ansteigt, deckt sich zwar mit dem bereits von Bierry und Nitzescu u.s.w. erhobenen Befund, doch stehen sie vielleicht mit der hochgradigen Schwäche ausser der Pankreaslosigkeit in Zusammenhang.

III. Zusammenfassung.

1. Der Wert des sog. geb. Blutzuckers nach Insulinverabreichung ist bald höher als zuvor, bald bleibt er nahezu unverän-

dert, aber er wird durch die Veränderung der Insulindosis innerhalb gewisser Grenzen nicht beeinflusst.

2. Diese Erhöhung des sog. geb. Blutzuckers wird durch Eiweiss-Fettdiät garnicht beeinflusst.

3. Die durch Eiweiss-Fettdiät verstärkte alimentäre Senkung des sog. geb. Blutzuckers wird durch Insulineinspritzung eindeutig beseitigt.

4. Die durch Hunger herbeigeführte alimentäre Steigerung des sog. geb. Blutzuckers wird durch Insulinverabreichung in gewissem Masse unterdrückt.

5. Wenn das Pankreas teilweise (über zwei Drittel) entfernt wurde, steigt bald der sog. geb. Blutzucker an, bald bleibt er nahezu unverändert, doch wird derselbe nach Zuckerzufuhr nicht bedeutend beeinflusst.

6. Nach Totalexstirpation des Pankreas kommt eine starke Steigerung des sog. geb. Blutzuckers gleichzeitig mit der Steigerung des freien Blutzuckers zum Ausdruck. Aber man muss dabei ausser der Folge der Pankreasentfernung an ein anderes Moment denken, nämlich dass durch Pankreatektomie die Tiere in Unterernährung bzw. hochgradige Schwäche geraten.

B. Über den Einfluss der Nebennierenfunktion auf den sog. geb. Blutzucker.

I. Der Einfluss des Adrenalins.

Seit langer Zeit ist es bekannt, dass unter Einfluss des Adrenalins, das das Hormon der Nebenniere ist, der freie Blutzucker ansteigt und gleichzeitig das Leberglykogen in der Regel abnimmt. Auch liegen zahlreiche Untersuchungen über das Verhalten des sog. geb. Blutzuckers nach Adrenalinverabreichung vor, ohne aber miteinander übereinzustimmen. Nach Condorelli (1923) zeigt der sog. geb. Blutzucker bei Menschen unter Einfluss des Adrenalins in relativem Sinne immer und im absoluten Sinne bisweilen eine Senkung, d. h. in absoluter Zahl blieb er unverändert oder nahm um ein Geringes ab, um später wieder etwas anzusteigen. Mehrere andere Autoren konnten dies alles vollkommen bestätigen

und stellten ferner fest, dass die Wirkung des Adrenalins auch bei Hunden und Kaninchen im Wesentlichen mit der beim Menschen übereinstimmt (Burgi (1925), Bierry, Rathery u. Levina (1922), Toscano(1927), Imanishi(1933) u.s.w.). Im Gegenteil sah Forsyth (1923) bei hungernden Kaninchen nach Injektion von Präparat aus Nebenniere nicht nur den freien Blutzucker, sondern auch die "difference value", d. h. die Reduktionssteigerung durch saure Hydrolyse des mit Phosphorwolframsäure enteiweissten Blutes, ansteigen. Lepine e.s. (1913) beobachtete auch nach Adrenalineinspritzung bisweilen eine Steigerung des sog. geb. Blutzuckers. In seiner Veröffentlichung hat Yano(1930) berichtet, dass der sog. geb. Blutzucker bei Kaninchen nach Einspritzung von Adrenalin in kleiner Menge mehr oder weniger zunimmt, aber durch relativ grosse Dosen hingegen in der Mehrzahl der Fälle gleichzeitig mit der Steigerung des freien Blutzuckers abnimmt. Iketani (1927) konnte nicht über nennenswerte Veränderung des sog. geb. Blutzuckers bei Hunden nach Adrenalinverabreichung berichten, aber er bemerkte ungefähr in der Hälfte der Fälle eine geringe Abnahme desselben.

Auf jeden Fall sind die verschiedenen Autoren über das Verhalten des sog. geb. Blutzuckers unter Einfluss des Adrenalins nicht immer einig. Aus diesem Grunde wurde die Beeinflussung des sog. geb. Blutzuckers durch das Mengenverhältnis des eingespritzten Adrenalins zuerst beobachtet. Zu diesem Zweck wurden den Tieren nach 24 stündigem Fasten nacheinander zunehmend verschiedene Mengen von Adrenalin jeden 3. oder 4. Tag subcutan injiziert und danach der Gehalt des freien wie auch des sog. geb. Blutzuckers 6 Stunden lang (1St. 2.5St. 4St. 6St.) vergleichend beobachtet. Die meisten diesbezüglichen Prozeduren wurden in derselben Weise ausgeführt, wie sie in meiner vorangehenden Mitteilung beschrieben sind. Im folgenden sind die Versuchsresultate an vier Hunden in Tabellenform angeführt.

Wie aus der obigen Tabelle zu entnehmen ist, steigt der freie Blutzucker unter Adrenalineinfluss und je mehr Adrenalin man einspritzt, desto stärker und länger dauernd tritt die Steigerung desselben auf. Dabei zeigt der sog. geb. Blutzucker keine

Tabelle VII.

Nr. des Hundes	Datum	Körpergewicht	Menge d. 0.1%igen Adrenalins.	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) Vor der Adrenalininjekt.	1St.n,d. Adrenalininjekt.	2.5St.	4St.	6St.
		kg.	cc						
Nr. 46	28/I	9,5	0.5	Fr. Z.	0,092	0,115	0,122	0,127	0,118
				Geb. Z.	0,077	0,072	0,080	0,068	0,077
	3/II	9,3	1,5	Fr. Z.	0,092	0,149	0,150	0,134	0,117
				Geb. Z.	0,093	0,094	0,097	0,095	0,098
	17/ „	9,3	3,0	Fr. Z.	0,082	0,148	0,171	0,133	0,110
				Geb. Z.	0,082	0,078	0,082	0,087	0,085
Nr. 47	28/I	9,7	0,5	Fr. Z.	0,113	0,156	0,136	0,131	0,122
				Geb. Z.	0,108	0,103	0,108	0,108	0,115
	3/II	9,5	1,5	Fr. Z.	0,099	0,118	0,165	0,145	0,108
				Geb. Z.	0,135	0,137	0,138	0,137	0,130
Nr. 48	30/I	6,5	0,4	Fr. Z.	0,096	0,110	0,124	0,113	0,101
				Geb. Z.	0,110	0,111	0,112	0,108	0,105
	8/II	6,6	1,0	Fr. Z.	0,102	0,148	0,144	0.150	0,144
				Geb. Z.	0,083	0,085	0,084	0,100	0,100
	17/ „	6,8	2,0	Fr. Z.	0,107	0,127	0,129	0,121	0,113
				Geb. Z.	0,101	0,103	0,101	0,107	0,101
Nr. 49	30/I	6,5	0,4	Fr. Z.	0,097	0,117	0,108	0,085	0,086
				Geb. Z.	0.097	0,104	0,108	0,099	0,103
	8/II	6,7	1,0	Fr. Z.	0,103	0,153	0,110	0,105	0,098
				Geb. Z.	0,109	0,111	0,099	0,099	0,098
	19/„	7,0	2,0	Fr. Z.	0,094	0,125	0,177	0,166	0,154
				Geb. Z.	0,102	0,103	0,118	0,109	0,111

nennenswerte Veränderung und zwar bleibt er ohne Beziehung zu der Menge des eingespritzten Adrenalins innerhalb der Grenzen der Anwendung desselben.

Der Einfluss der Ernährung auf den freien sowie den sog. geb. Blutzucker nach Adrenalineinspritzung ist bisher sehr wenig untersucht worden. Vor kurzem hat Yoshio (1933) in Bezug auf den freien Blutzucker festgestellt, dass die Adrenalinhyperglykämie bei Eiweiss-Fettnahrung auffallend stärker als bei gemischter Nahrung zum Ausdruck kommt und die dadurch verstärkte Adrenalinhyperglykämie durch Kohlenhydratzusatz zur Grundkost leicht wiederhergestellt wird. Bei solcher Sachlage sei es von Bedeutung, den

Einfluss der Eiweiss-Fettnahrung auf den sog. geb. Blutzucker nach Adrenalinverabreichung zu studieren.

Bei diesem Versuche wurden die Tiere eine bestimmte Zahl von Tagen zuerst mit kohlenhydratreicher gemischter Nahrung, dann mit Eiweiss-Fettdiät und zuletzt mit Kohlenhydartzusatz zur Grundkost, genährt, und in jeder Untersuchungsperiode eine bestimmte Menge Adrenalin nach 24 stündigem Fasten subcutan eigespritzt und danach der Wert des freien wie auch des sog. geb. Blutzuckers stündlich 3 Stunden lang vergleichend beobachtet.

Tabelle VIII.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge d. Adrenalins (0,1%)	Fr. Z od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) Vor der Adrenalininjekt.	1St. n. d. Adrenalininjekt.	2St.	3St.
			kg.	cc					
Nr. 50	Gewöhnliche Kost	20/VI	9,4	1,5	Fr. Z.	0,114	0,136	0,131	0,119
					Geb. Z.	0,120	0,117	0,134	0,137
	Eiweiss-Fettdiät	25/ „	9,2		Fr. Z.	0,112	0,163	0,206	0,208
					Geb. Z.	0,133	0,126	0,142	0,144
	Kohlenhydratzusatz	1/VII	9,5		Fr. Z.	0,097	0,115	0,122	0,134
					Geb. Z.	0,124	0,126	0,126	0,117
Nr. 51	Gewöhnliche Kost	20/VI	7,5	1,2	Fr. Z.	0,092	0,110	0,161	0,172
					Geb. Z.	0,101	0,096	0,103	0,109
	Eiweiss-Fettdiät	25/ „	7,4		Fr. Z.	0,096	0,103	0,136	0,190
					Geb. Z.	0,098	0,093	0,091	0,095
	Kohlenhydratzusatz	1/VII	7,5		Fr. Z.	0,079	0,138	0,127	0,074
					Geb. Z.	0,117	0,111	0,101	0,114
Nr. 52	Gewöhnliche Kost	28/VI	7,5	1,2	Fr. Z.	0,081	0,110	0,119	0,115
					Geb. Z.	0,119	0,127	0,122	0,122
	Eiweiss-Fettdiät	4/VII	7,3		Fr. Z.	0,072	0,118	0,157	0,150
					Geb. Z.	0,125	0,121	0,111	0,115
	Kohlenhydratzusatz	8/ „	7,4		Fr. Z.	0,084	0,108	0,118	0,109
					Geb. Z.	0,125	0,134	0,130	0,136
Nr. 53	Gewöhnliche Kost	15/VII	9,5	1,5	Fr. Z.	0,103	0,121	0,126	0,135
					Geb. Z.	0,118	0,117	0,133	0,115
	Eiweiss-Fettdiät	19/ „	9,5		Fr. Z.	0,102	0,121	0,189	0,194
					Geb. Z.	0,119	0,127	0,117	0,132
	Kohlenhydratzusatz	23/ „	9,2		Fr. Z.	0,095	0,121	0,136	0,119
					Geb. Z.	0,108	0,117	0,120	0,124

Nr. 54	Gewöhnliche Kost	18/IX	9,4	0,5	Fr. Z.	0,091	0,089	0,102	0,109
					Geb. Z.	0,114	0,119	0,119	0,120
	Eiweiss-Fett-diät	22/ „	9,3		Fr. Z.	0,089	0,100	0,137	0,142
					Geb. Z.	0,112	0,106	0,122	0,118
	Kohlenhydrat-zusatz	26/ „	9,5		Fr. Z.	0,077	0,086	0,086	0,097
					Geb. Z.	0,110	0,133	0,127	0,130
Nr. 55	Gewöhnliche Kost	7/X	10,2	0,5	Fr. Z.	0,107	0,098	0,114	0,117
					Geb. Z.	0,109	0,102	0,116	0,118
	Eiweiss-Fett-diät	11/ „	10,5		Fr. Z.	0,087	0,102	0,120	0,116
					Geb. Z.	0,116	0,117	0,108	0,112
	Kohlenhydrat-zusatz	14/ „	10,5		Fr. Z.	0,102	0,109	0,109	0,105
					Geb. Z.	0,099	0,118	0,118	0,104
Nr. 56	Gewöhnliche Kost	7/X	11,8	0,6	Fr. Z.	0,100	0,112	0,124	0,109
					Geb. Z.	0,127	0,106	0,107	0,119
	Eiweiss-Fett-diät	11/ „	10,9		Fr. Z.	0,080	0,080	0,096	0,096
					Geb. Z.	0,118	0,115	0,117	0,117
	Kohlenhydrat-zusatz	14/ „	11,4		Fr. Z.	0,081	0,089	0,088	0,091
					Geb. Z.	0,100	0,103	0,106	0,111

Wie die Tabelle II. zeigt, stimmen diese Versuchsresultate in Bezug auf den freien Blutzucker mit der Angabe Yoshios vollkommen überein. Dabei wird der Wert des sog. geb. Blutzuckers durch Wechsel der Ernährungsweise gar nicht beeinflusst.

II. Der Einfluss der Nebennierenentfernung.

Die Entfernung der Nebennieren hat bei Hunden und Katzen, d. h. Säugetieren, die dabei akut zugrunde gehen, fast stets eine Abnahme des Leberglykogens zur Folge (Porges (1910), Bornstein (1922) u.s.w.). Bei Kaninchen und Ratten kann sie dagegen, wenn diese Tiere die Nebennierenentfernung überleben, weil sie ausserhalb der Nebennieren ein akzessorisches Rindengewebe haben, vorübergehen (Schwarz 1910, Kahn 1912, Catan 1921, Kisch 1924 u.s.w.). Der erstmals von Bierry und Malleoisel (1908) erhobene Befund, dass die Nebennierenentfernung zu einer Blutzuckerabnahme führt, ist bisher nicht sicher zu erklären. Auch ist es noch fraglich, ob die Blutzuckersenkung der Glykogenverarmung der Leber vorangeht oder folgt. Wenngleich eine Anzahl von Forschern angeben, dass die alimentäre Hyperglykämie nach Nebennierenentfernung viel geringer als normal ist, haben

einige andere Autoren im Gegenteil gerade eine hochgradige Hyperglykämie gefunden. Bei der Addisonschen Krankheit, die auf der Funktionsstörung der Nebennieren beruht, befindet sich auch die Toleranz des Kohlenhydrates bald abnorm höher, bald aber niedriger als normal. Kawanishi und Kodama (1933) berichteten eine Steigerung des sog. geb. Blutzuckers in zwei Fällen von Addisonscher Krankheit. Ausserdem ist der Einfluss der Nebennierenschädigung auf den sog. geb. Blutzucker, soweit sich bei Durchsicht der Literatur feststellen lässt, bisher nicht experimentell bearbeitet worden. Um diese Frage zu klären, wurde den Hunden durch einzeitige Operation der grösste Teil der Nebennieren entfernt und die dabei eingetretenen alimentären Veränderungen am sog. geb. Blutzucker beobachtet. Übereinstimmend wird von vielen Forschern berichtet, dass die Zurücklassung recht kleiner Nebennierenreste (1/8–1/4 der gesamten Rindenmasse der Nebennieren) genügt, um das Leben zu erhalten, während die Tiere nach vollständiger Nebennierenentfernung bald zu sterben pflegen. Daher wurde etwa ein Viertel der gesamten Nebennieren auch in meinen Experimenten zurückgelassen. Die Versuchsresultate an vier Hunden sind übersichtlich in Tabelle IX dargestellt.

Tabelle IX.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des Tr. Zuckers	Fr. Z. od. Geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) Vor der Zuckerzufuhr	1St. n. d. Zuckerzufuhr	2St.	3St.	Dat. d. Operation
			kg.	g.						
Nr. 57	Vor der Operation	28/VI	12,3	50	Fr. Z.	0,093	0,120	0,110	0,088	3/7
					Geb. Z.	0,088	0,098	0,098	0,092	
	Nach der Operation	8/VII	11,8		Fr. Z.	0,076	0,147	0,139	0,085	
					Geb. Z.	0,107	0,133	0,139	0,136	
		17/ „	12,0		Fr. Z.	0,095	0,132	0,142	0,086	
					Geb. Z.	0,099	0,102	0,118	0,121	
Nr. 58	Vor der Operation	10/VII	10,0	40	Fr. Z.	0,108	0,141	0,125	0,090	16/7
					Geb. Z.	0,107	0,113	0,115	0,103	
	Nach der Operation	19/ „	9,2		Fr. Z.	0,090	0,181	0,136	0,076	
					Geb. Z.	0,158	0,163	0,157	0,150	
		24/ „	10.7		Fr. Z.	0,095	0,141	0,118	0,075	
					Geb. Z.	0,134	0,119	0,123	0,126	

Nr. 59	Vor der Operation	30/VIII	11,0	40	Fr. Z.	0,085	0,145	0,121	0,117	7/9
					Geb. Z.	0,096	0,093	0,101	0,110	
	Nach der Operation	18/IX	9,2		Fr. Z.	0,094	0,159	0,149	0,065	
					Geb. Z.	0,131	0,147	0,150	0,137	
Nr. 60	Vor der Operation	3/IX	10,2	40	Fr. Z.	0,095	0,124	0,115	0,094	12/9
					Geb. Z.	0,103	0,098	0,102	0,109	
	Nach der Operation	23/ „	8,7		Fr. Z.	0,087	0,140	0,147	0,102	
					Geb. Z.	0,117	0,118	0,117	0,117	
		28/ „	9,0		Fr. Z.	0,103	0,108	0,115	0,090	
					Geb. Z.	0,140	0,134	0,148	0,148	

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, stimmen die Resultate meiner Untersuchung an vier Hunden im allgemeinen miteinander ganz gut überein. Der Nüchternwert des freien Blutzuckers wird durch Nebennierenentfernung gar nicht beeinflusst oder nimmt nur wenig ab, aber der des sog. geb. Blutzuckers tritt dabei mehr oder weniger höher als vor der Operation auf. Die Steigerung des freien Blutzuckers nach Zuckerzufuhr wird durch diese Operation erheblich stärker als zuvor, um sich später im Laufe der Zeit wiederherzustellen. Ganz anders verhält sich die alimentäre Veränderung des sog. geb. Blutzuckers nach der Nebennierenentfernung als vor der Operation, sodass hier der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr nicht eine Senkung, sondern eine Steigerung zeigt. Mit anderen Worten steigt der durch Nebennierenentfernung bereits vermehrte sog. geb. Blutzucker nach peroraler Zuckerzufuhr in der Mehrzahl der Fälle gleichzeitig mit der Steigerung des freien Blutzuckers noch mehr an. Das Ergebnis, dass nach der Nebennierenentfernung der sog. geb. Blutzucker im allgemeinen sich erhöht, steht in Einklang mit den bei der Addisonschen Krankheit von Kawanishi und Kodama berichteten Befunden.

III. Zusammenfassung.

1. Der Gehalt des sog. geb. Blutzuckers wird durch Adrenalineinspritzung innerhalb gewisser Grenzen nicht eindeutig beeinflusst.

2. Bei Eiweiss-Fettdiät zeigt der sog. geb. Blutzucker nach Adrenalinverabreichung keine nennenswerte Beeinflussung.

3. Der Nüchternwert des sog. geb. Blutzuckers tritt durch Entfernung der Nebennieren (ca. drei Viertel) meistens mehr oder weniger höher als normal auf.

4. Nach der Nebennierenentfernung (ca. drei Viertel) zeigt der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr in der Mehrzahl der Fälle eine merkbare Steigerung.

5. Die Steigerung des freien Blutzuckers nach Zuckerzufuhr wird dabei mehr oder weniger stärker als zuvor, um sich später im Laufe der Zeit wiederherzustellen.

LITERATUR.

Bierry, H. Rathery, F. et Kourilsky, R. (1924): C. r. Soc. Biol., **90**, 36: zit. n. Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 223.

Bierry, H. u. Malleoisel, J. (1908): zit. n. oben, **1**, 195.

Bierry, H. Ratherry, F. et Levina, L. (1922): zit. n. Grevenstuk, A. Ergeb. d. Physiol., **28**, 219.

Bornstein, A. (1922): Zeitschr. f. exp. Med., **37**, 24; Biochem. Zeitschr., **132**, 139.

Burgi, A. (1925): Minerva med. 5, Nr. 25. zit. n. Grenvenstuk: Ergeb. d. Physiol., **28**, 218.

Catan, M. A. (1921): zit. n. Trendelenburg, P. (1934): Die Hormone, **1**, 195.

Caltaviano u. Liotta: zit. n. Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 224.

Cammidge, L. (1923): Brit. med. Journ., **1**, 787.

Condorelli, L. (1923): zit. n. Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 218.

Derselben u. Gournay, J. (1924): C. r. Soc. Biol., **90**, 615: zit. n. oben., **28**, 207. u. zit. n. Trendelenburg, P. (1934): Die Hormone, **2**, 314.

Derselbe (1924): Bull. accad. Med. Roma, **50**, 97: zit. n. oben, **28**, 223.

„ Ann. clin. terap. zit. n. oben, **28**, 208.

„ C. r. Soc. Biol., **90**, 536; zit. n. oben, **28**, 208.

De. Dominicis, N. (1889): zit. n. Trendelenburg, P. (1934): Die Hormone, **2**, 295.

Forsyth, A. C. (1923): zit. n. Grevenstuk, A. (1929): **28**, 226.

Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 215.

Iketani, J. (1927): Tokyo Igakkaizasshi, **41**, 1404.

Imanishi, Y. (1929): Kyoto Huritsu Ikadaigaku Zasshi, **3**, 127, 579.

Kahn, R. H. (1912): Pflügers Archiv, **144**, 251, 396.

Kamada, A. (1929): Kyoto Huritu Ikadaigaku Zasshi, **2**, 1835.

Kawanishi u. Kodama: zit. n. Iizuka, N. (1930): Nippon Naikagakkai Zasshi, **18**, 22.

Kisch, B. (1924): Klin. Wochenschr., **3**, 1661.

Krebs u. Munk: zit. n. Trendelenburg, P. (1934): Die Hormone, **2**, 295.

Lépine, R. (1913): C. r. Soc. Biol., **74**, 76; zit. n. Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 226.

Mc. Cormick, N. A. and Macleod, J. J. R. (1923): Amer. Journ. of Physiol., **63**, 389.

Nitzescu, J. J. u. Popescu-Inotesti, C. (1923): C. r. Soc. Biol., **89**, 1403; zit. n. Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 213.

Porges, O. (1910): Zeitschr. f. klin. Med., **69**, 341.

Schwarz, O. (1910): Pflügers Archiv, **134**, 259.

Scott, A. D. and Best, C. H. (1924): Amer. Journ. of Physiol., **68**, 144.

Simonnet, H. u. Mme. Randoim (1924): Bull. Soc. de chim. biol., **6**, 44; zit. n. Grevenstuk, A. (1929): Ergeb. d. Physiol., **28**, 213.

Staub, H. (1925): Insulin A. Aufl. Berlin: Julius Springer: zit. n. Grevenstuk, **28**, 213.

Toscano, C. (1927): Policlinico. sez. med. zit. n. Grevenstuk, A.: Ergeb. d. Physiol., **28**, 219.

Yano, N. (1930): Mitteil aus d. med. Akad. zu Kyoto, **4**, 1, 45.

Yoshio, K. (1933): Journ. of Biochem., **17**, 1, 12.

v. Mering, J. u. Minkowski (1889): Zeitschr. f. klin. Med., **10**, 393.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

ALTERSVERÄNDERUNGEN AM GESAMTSTICKSTOFF UND AN DEN LIPOIDEN IM KINDERHIRN.

Von

J. A. SMORODINZEW und K. W. BEBESCHIN.

(*Aus dem biochemischen Laboratorium des Instituts für Gesundheitsschutz der Kinder und Jugendlichen zu Moskou. Direktor: E. J. Schurpe.*)

(Eingegangen am 11. August 1936.)

Unter sämtlichen anderen Organen zeichnet sich das Gehirn durch seinen hohen Lipoidengehalt aus. Das ist der Grund, weshalb wir beim Studium der Altersveränderungen unser Augenmerk auf das Verhältnis des Gesamtstickstoffs zu den Lipoiden während der Wachstumsperiode der Kinder richteten.

Untersuchungsmethodik.

Zwecks Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjedahl und des Lipoidengehalts nach Ätherextraktion im Soxhletapparat, wurden je vier Einwagen von der weissen und grauen Substanz des Grosshirns, des Kleinhirns und vom verlängertem Mark, 24 St. nach Ableben des Kindes, entnommen.

Die Analysenergebnisse sind in % zur rohen Einwage umgesetzt.

Experimenteller Teil.

Der Stickstoffgehalt in der grauen Grosshirnsubstanz schwankt bei Kindern von 1,18% bis 2,17% (die Zahlen 1,03% —1,04% sind durch Zufall entstanden), steigt allmählich im 5. Lebensjahr an und zeigt sein Maximum (2,17%) im 10. Jahr.

Der Gesamtstickstoff ist in der weissen Substanz etwas höher, als in der grauen und zeigt eine Wachstumtendenz mit dem steigenden Alter u.zw. im 5. (1,72%) und 10. Lebensjahr (2,24%) treten zwei Maxima auf.

Der Stickstoffgehalt ist im Kleinhirn höher, als in der weissen

Tabelle I. Gesamtstickstoff im Kinderhirn nach Alter.

Alter (Jahren)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Erwachsener
Graue Grosshirnusbstanz	1.18	1.19	1.30	1.34	1.35	1.36	(1.04)	1.38	1.63	2.17	1.57	1.28	(1.03)	—	—	—
	1.33	1.29	1.42	1.35	1.52	—	1.26	1.62	1.98	—	—	1.80	1.58	—	—	—
	1.35	1.62	1.49	1.52	1.66	—	—	—	—			—	1.75	—	—	—
Mittel	1.29	1.37	1.40	1.40	1.51	1.36	1.26	1.50	1.81	2.17	1.57	1.54	1.6 7	—	—	—
Soula[1]																1.50
E. Abderhalden u. A. Weil[2]																1.74
A. Weil[3]																2.59
Weisse Grosshirnsubstanz	1.35	1.45	1.19	1.15	1.58	1.38	1.36	2.16	1.41	2.11	1.44	1.60	1.18	1.24		
	1.36	1.63	1.61	1.57	1.85	1.60	1.59	—	1.46	2.37	1.89	1.80	2.02	—		
	1.53	1.65	1.62	1.68	—	—	—	—	1.71	—	—	2.11	—	—		
Mittel	1.41	1.58	1.47	1.60	1.72	1.49	1.48	2.16	1.53	2.24	1.67	1.86	1.60	1.24		
Soula[1]																1.74
E. Abderhalden u. A. Weil[2]																1.70
A. Weil[3]																5.10
Kleinhirn	1.47	1.52	1.46	1.59	1.27	1.38	1.50	1.70	1.76	—	1.57	1.65	1.21	1.56		—
	1.50	1.69	1.65	1.67	1.77	1.72	1.98	2.11	1.78	—	1.70	1.90	2.06	—		—
	1.65	1.82	1.96	1.87	1.92	—	—	—	1.82	—	—	—	—	—		—
	1.71	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
Mittel	1.58	1.68	1.69	1.71	1.65	1.55	1.74	1.91	1.79	—	1.64	1.78	1.64	1.56		—
A. Weil[3]																3.18
Verlängertes Mark	1.42	1.54	1.57	1.54	1.48	1.11	1.59	1.63	1.46	2.17	1.70	1.36	2.04	1.23		—
	1.52	1.86	1.72	1.78	1.58	1.50	2.17	1.68	1.62	—	2.22	1.47	—	—		—
	1.53	2.11	1.73	1.83	1.95	—	—	—	1.71	—	—	1.62	—	—		—
	1.56	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
Mittel	1.51	1.87	1.67	1.72	1.67	1.31	1.88	1.66	1.60	2.17	1.96	1.48	2.04	1.23		—

1) cit. n. Oppenheimer, Handb. d. Biochemie
2) Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 423, 1913
3) Zeitschr. f. physiol. Chem **89**, 349, 1914

und grauen Grosshirnsubstanz, steigt im 4. Jahr an und erreicht sein Maximum im 8. Jahr.

Der Stickstoffanstieg geht zeitlich dem des Grosshirns voran, folglich setzt die Entwicklung der Stickstoffverbindungen im Kleinhirn früher als im Grosshirn ein.

Im verlängerten Mark tritt, im Gegensatz zu anderen Gehirnabschnitten, das erste Stickstoffmaximum im 2. und das zweite im 10. J. (2,17%) in Erscheinung. Die zunehmende Entwicklung von aktiven Stickstoffverbindungen setzt im verlängerten Mark (2. J.) und Kleinhirn (4. J.) früher als im Grosshirn ein. Das 2. Maximum fällt in sämtlichen vier Abschnitten auf das 10. Jahr.

Der Lipoidendurchschnittsgehalt der grauen Grosshirnsubstanz ist etwa 4–5%; zuweilen erreicht er mehr als das Doppelte. Das erste Maximum (5,09%) wurde von uns im 4. J., das sehr beträchtliche zweite (10,47%) im 6. J. und das dritte (8,75%) im 12. J. vermerkt. Der durchschnittliche Lipoidengehalt der weissen Grosshirnsubstanz übertrifft den der grauen Substanz beinah um das Dreifache. Die Lipoidenvermehrung steigt steil um das 4. J. (von 6,45% bis 14.15%) an; worauf ein zweites (16,04%) im 6. J. und ein drittes Maximum (17,98%) im 12. J. folgt.

Der Lipoidengehalt des Kleinhirns macht beinah die Hälfte des der weissen Grosshirnsubstanz aus. Der erste Anstieg erfolgt im 2. J. (6,52%), der zweite im 6. J. (7,9%), der dritte im 12. J. (7,13%).

Der Lipoidengehalt des verlängerten Marks ist, entsprechend seinem Reichtum an Leitungsbahnen, annährend so gross, wie der der weissen Grosshirnsubstanz. Das erste Maximum tritt im 4. Jahr (12,64%), das zweite im 6. J. (14,12%) und das dritte im 12. J. in Erscheinung.

Die Evolution der Lipoide im Kinderhirn macht im Vergleich zur Evolution der Stickstoffverbindungen eine gewisse Terminverschiebung durch, u.zw. geht die Anhäufung von Stickstoffverbindungen der der Lipoide voraus; das 5. und 10. J. inbezug auf Stickstoffverbindungen, das 6. und 12 inbezug auf Lipoide. Das 4. J. gilt für sämtliche Fälle als das kritische Jahr.

TABELLE II.

Der Gesamtgehalt an Lipoiden im Kinderhirn nach Alter.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Erwachsener
Graue Grosshirnsubstanz	4.40 4.42 4.44 4.60	4.52 4.87 — —	4.50 4.55 4.59 —	4.68 5.05 5.35 —	3.41 4.85 5.54 —	9.53 11.40 — —	3.26 6.52 — —	5.36 5.60 — —	3.75 4.45 6.03 —	3.57 5.92 — —	5.14 6.10 — —	7.46 — — —	4.76 — — —	4.54 — — —	— — — —
Mittel	4.47	4.70	4.45	50.9	4.60	10.47	4.89	5.48	4.74	4.75	5.62	7.46	4.76	4.54	—
Schlossberger[4]	3.51— 3.82														4.75— 4.84
Weisse Grosshirnsubstanz	4.83 5.51 7.25 8.19	7.17 14.30 — —	14.00 14.60 14.68 —	14.03 14.07 15.86 —	16.07 17.21 17.90 —	17.64 16.28 17.21 —	13.69 16.66 — —	14.86 16.26 — —	7.16 14.10 16.12 —	13.96 21.96 — —	19.52 23.20 — —	17.41 17.49 18.96	13.80 16.72 —	16.91 — — —	— — — —
Mittel	6.45	10.74	14.42	14.65	17.06	16.04	15.18	15.56	12.69	17.95	21.36	17.98	15.26	16.91	—
Kleinhirn	4.17 4.49 5.25 6.29	6.47 6.56 — —	5.48 5.79 5.95 —	4.78 5.89 6.31 —	6.75 6.99 7.77 —	6.83 8.96 — —	5.43 7.18 — —	5.85 7.13 — —	4.03 5.29 6.87 —	4.47 6.51 — —	5.41 7.19 — —	6.33 7.93 — —	5.49 7.17 — —	6.66 — — —	— — — —
Mittel	5.05	6.52	5.74	5.66	7.17	7.90	6.81	6.49	5.40	5.49	6.30	7.13	6.33	6.66	—
Verlängertes Mark	8.34 8.41 9.70 11.67	11.02 11.45 — —	9.08 10.80 12.24 —	11.25 11.35 14.81 —	11.42 13.23 13.88 —	13.86 14.37 — —	10.87 13.59 — —	12.20 13.43 — —	6.31 10.14 13.38 —	11.81 — — —	11.85 14.70 — —	15.29 — — —	9.93 12.51 — —	9.17 — — —	— — — —
Mittel	9.53	11.24	10.71	12.64	12.84	14.12	12.23	12.82	12.92	11.81	13.28	15.29	11.22	9.17	—

1). Ann. d. Chem. u. Pharmazie. **36**, 119. 1853

Tabelle III.
Trockener Rückstand, Eiweisskörper und Lipoide der grauen Grosshirnsubstanz in %.

Alter in Jahren	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Trockener Rückstand	13.44	14.28	14.69	15.53	15.13	15.63	16.74	14.79	15.78	14.78	16.43	16.12	15.22	15.30
Eiweiss	8.06	8.56	8.75	8.75	9.44	8.50	7.88	9.37	11.31	(13.56)	9.81	9.17	10.44	—
Eiweiss in % zum trockenen Rückstand	59.97	59.94	59.56	56.34	60.79	54.38	47.07	63.35	71.67	(91.75)	59.71	56.89	68.60	—
Lipoide	4.47	4.70	4.55	5.09	4.60	—	4.89	5.48	4.74	4.75	5.62	—	4.76	4.54
Lipoide in % zum Rückstand	33.26	32.91	30.97	32.77	30.40	—	29.21	37.05	30.04	32.13	34.21	—	31.28	29.67
$\frac{\text{Lipoide}}{\text{Eiweisskörper}}$	0.55	0.55	0.52	0.58	0.54	—	0.62	0.58	0.42	(0.35)	0.57	—	—	—
$\frac{\text{Lipoide}}{\text{Gesamtstickstoff}}$	3.17	3.47	3.26	3.63	3.05	—	3.88	3.63	2.62	(2.19)	3.50	—	4.43	—

Der Gesamtstickstoff auf Eiweiss[1] bezogen, stellt folgendes Entwicklungsbild dieses wichtigsten chemischen Gehirningredienten dar:

Bei Kindern entfallen im Durchschnitt auf 100 g grauer Grosshirnsubstanz 9,2 g Eiweiss und 4,9 g Lipoide. Auf diese Weise besteht fast ⅓ Trockensubstanz aus Lipoiden und ⅔ aus Eiweiss. Allein dieser Wert wird erst im 4–5 Lebensjahr erreicht. In den ersten 3–4 J. geht ein fortschreitender Anstieg der Lipoidenmenge (+14%) und ganz besonders der Eiweisskörper (+16%) vor sich. Des weiteren kommt es zum Stillstand, wobei die Eiweisskörper im 9–11 J. und die Lipoide im 8–11 J. ihre Gipfel aufzeigen. Die Verhältniszahl der Lipoide zum Eiweiss ist gleich 0,5–0,6 und die der Lipoide zum Gesamtstickstoff bleibt etwa 3,5 (Tab. III) hoch.

Auch in der weissen Substanz bemerken wir mit dem Alter ein allmähliches Aufsteigen der Eiweisskörper und Lipoide bis zum 5. Lebensjahr. Allein die Verhältnisse bleiben hier umgekehrt: eine Steigerung der Eiweissmenge um 22% und eine Vermehrung der Lipoide um das Dreifache eben im 1. Lebensjahr.

Das Verhältnis der Lipoide zum Eiweiss erreicht sein Maximum im 11–14 J. Der Lipoidengehalt übersteigt bereits vom 3. J. den Gesamtstickstoff annähernd um das Zehnfache (Tab. IV).

Als Kuriosum mag erwähnt sein, dass im Kleinhirn, wo wir keine Trennung der weissen von der grauen Substanz durchführten, der Eiwesis- und Lipoidengehalt fast genau so hoch ist, wie in der grauen Grosshirnsubstanz. Die Eiweisskörper nehmen langsam bis zum 4. Lebensjahr (+8%) und die Lipoide schnell bis zum 6. J. zu (+7,7%). Das Verhältnis der Lipoide zum Eiweiss und Gesamtstickstoff bleibt ungefähr dasselbe wie bei der grauen Substanz (Tab. V).

Im verlängerten Mark bleibt das Verhältnis der Lipoide zum Eiweiss zwei, vielleicht gelegentliche Anstiege im 6. und 12. J. ausgenommen gleich 1 (Tab. VI).

+) Dabei erhalten wir eine erhöhte Eiweissmenge, weil der Gesamtstickstoff nicht nur allein auf die Eiweisskörper sich bezieht.

Tabelle IV.
Rückstand, Eiweisskörper und Lipoide der weissen Grosshirnsubstanz in %.

Alter in Jahren	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Rückstand	16.20	21.18	24.22	25.60	28.32	26.86	26.75	27 33	28.76	27.07	29.03	28.93	31.29	28.65
Eiweiss	8.81	9.88	9.19	10.00	10.75	9.31	9.25	13.50	9.56	14.00	10.44	11.61	10.00	7.75
Eiweiss in % zum Rückstand	54.38	46.65	37.98	40.65	30.44	34.66	34.58	49.40	33.21	51.72	37.25	40.13	31.96	27.05
Lipoide	6.45	10.74	14.48	14.65	17.06	16.04	15.18	15.56	12.69	17.95	21.36	17.98	15.26	16.91
Lipoide in % zum Rückstand	39.82	49.55	59.59	59.55	60.24	59.72	59.42	59.62	44.12	66.41	76.20	62.15	48.77	59.02
$\frac{\text{Lipoide}}{\text{Eiweisskörper}}$	0.73	1.06	1.57	1.47	1.57	1.72	1.64	1.15	1.33	1.28	2.05	1.48	1.53	2.18
$\frac{\text{Lipoide}}{\text{Gesamtstickstoff}}$	4.57	6.64	9.81	9.97	8.52	10.77	10.26	(5.72)	8.29	(6.92)	13.15	9.56	9.54	13.69

Tabelle V.

RüNckstand, Lipoide und Eiweisskörper des verlängerten Marks in %.

Alter in Jahren	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Rückstand	15.17	16.71	17.97	19.66	19.27	18 06	18.44	20.57	20.06	19.48	19.82	18.06	18.86	19.46
Eiweiss	9.88	10.50	10.56	10.68	10.31	9.68	10.86	11.94	11.19	—	10.25	11.13	10.25	9.75
Eiweiss in % zum Rückstand	65.13	62.84	63.00	54.32	53.50	53.60	58.89	58.05	55.78	—	51.72	61.64	54.22	50.10
Lipoide	5.05	6.52	5.74	5.66	7.17	7.90	6.81	6.49	5.40	5.49	6.30	7.13	6.33	6.66
Lipoide in % zum Rückstand	33.29	39.02	31.96	28.79	37.21	43.74	36.93	31.55	26.92	28.18	31.79	39.48	33.56	34.22
Lipoide / Eiweisskörper	0.51	0.62	0.54	0.53	0.70	0.81	0.63	0.54	0.49	—	0.61	0.64	0.62	0.68
Lipoide / Gesamtstickstoff	3.20	3.97	3.40	3.31	4.35	5.10	3.91	3.40	3.02	—	3.84	4.01	3.86	4.27

TABELLE VI.

Rückstand, Lipoide und Eiweisskörper des verlängerten Marks in %

Alter in Jahren	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Rückstand	16.70	21.86	22.32	24.07	23.37	23.48	24.10	25.20	24.64	22.94	24.77	22.83	25.45	22.57
Eiweiss	9.44	12.50	10.44	10.75	10.44	8.19	11.94	10.38	10.00	13.56	12.25	9.25	12.75	7.69
Eiweiss in % zum Rückstand	56.53	57.18	46.77	44.60	44.67	34.88	49.54	41.19	40.58	59.11	49.46	40.52	50.10	34.07
Lipoide	9.53	11.24	10.71	12.64	12.84	14.12	12.23	12.82	12.92	11.81	13.28	15.29	11.22	9.17
Lipoide in % zum Rückstand	57.07	51.54	47.99	52.51	54.94	60.14	50.75	50.87	52.44	51.48	53.61	66.97	44.09	40.63
$\frac{\text{Lipoide}}{\text{Eiweisskörper}}$	1.02	0.90	1.03	1.18	1.23	(1.72)	1.02	1.24	1.29	0.87	1.08	(1.69)	0.88	1.19
$\frac{\text{Lipoide}}{\text{Gesamtstickstoff}}$	6.31	6.11	6.41	7.35	7.69	10.78	6.51	7.72	8.08	5.44	6.79	10.33	5.50	7.46

Während in sämtlichen Gehirnabschnitten der Eiweissgehalt am häufigsten sich von 10–11% hält, ist der Lipoidengehalt weiten Schwankungen von 4,46% bis 21,36% zur rohen Einwage unterworfen.

Zusammenfassung.

In der grauen Substanz des Grosshirns, wo vorzugsweise eine Konzentration der Zellen stattfindet, finden wir doppelt so viel Eiweisskörper wie Lipoide vor, und in der weissen Substanz, wo wir mit einem Übermass von Leitungsbahnen, die zwecks Isolation mit Lipoiden umgeben sind, zu tun haben, konstatieren wir ein Übergewicht der Lipoide, die die Eiweisskörper um das 1½ bis Doppelte übertreffen.

Im Kleinhirn, wo mit unbewaffnetem Auge ein Überwiegen der grauen Substanz zu ersehen ist, wo gleichermassen Leitungsbahnen verlaufen, bleiben die Lipoide hinter der Eiweissmenge zurück. Im verlängerten Mark, wo die Leitungsbahnen massenhaft heruntersteigen, wo aber gleichfalls Kerne gehäuft auftreten, tritt ein Ausgleich zwischen Lipoiden- und Eiweissmenge ein.

Die Altersveränderungen kommen am deutlichsten in den ersten 4–5 J. zur Äusserung, und finden ihren Ausdruck sowohl in einer Zunahme der Stickstoffverbindungen wie auch vorzugsweise im Ansteigen der Lipoide. Hieraus sind wir den Schluss zu ziehen berechtigt, dass bereits im embrionalen Zustand und ganz besonders nach der Geburt, in sämtlichen Hirnabschnitten eine stärkere Zunahme der Zahl der Assotiationsfasern, und ganz besonders in der weissen Substanz des Gross- und Kleinhirns, stattfindet.

Schlussfolgerung.

1. Stärkere Altersveränderungen im chemischen Bestande des Kinderhirns kommen in den ersten 4 Lebensjahren zur Beobachtung.

2. In der grauen Substanz des Grosshirns tritt eine Vermehrung der Eiweisskörper stärker als der Lipoide hervor.

3. Im 5. Lebensjahr nimmt die Lipoidenmenge der weissen

Substanz des Grosshirns bis aufs 3-fache zu, der Eiweissgehalt aber um nur 22%.

4. Hinsichtlich der Wachstumintensivität, ist die weisse Substanz des Grosshirns der grauen, sowohl in bezug auf Lipoide, wie auch Eiweisskörper, überlegen.

5. In der grauen Substanz des Grosshirns übertrifft die Eiweissmenge die der Lipoide um das Doppelte und die Verhältniszahl der Lipoide zum Eiweiss bleibt dauernd konstant.

6. In der weissen Substanz des Grosshirns bleibt die Lipoidenmenge nur im 1. Jahr hinter der Eiweissmenge zurück; bereits vom 3. Jahr übertrifft sie die Eiweissmenge um das 1/2–2-fache.

7. Im Kleinhirn ist das Verhältnis der Lipoidenmenge zum Eiweissgehalt eben dasselbe, wie in der grauen Substanz des Grosshirns.

8. Im verlängerten Mark ist die Eiweissmenge gleich gross, wie die Lipoidenmenge.

9. Im Kinderhirn, entsprechend der viel schnelleren Zunahme der Grosshirnleitungsbahnen, überragt die Anreicherung an Lipoiden die der Eiweisskörper.

10. In sämtlichen Hirnabschnitten verbleibt der Eiweissgehalt am häufigsten in Grenzen von 10–11%, der Lipoidengehalt ist weiten Schwankungen von 4,46% bis 21,36% unterworfen.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

ÜBER DIE BESTIMMUNG DER FETTSTOFFE IM BLUT.

Von

YASUWO TAKATA.

(*Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Akademie Kumamoto. Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.*)

(Eingengangen am 14. August 1936)

Bis jetzt sind viele und mancherlei Methoden über die Bestimmung der Blutfettstoffe veröffentlicht worden. Ich habe früher die Bestimmungsmethoden der Gewebsfettstoffe untersucht mit der Absicht, den Fettumsatz im Nervengewebe der Taube mit *B*-Avitaminose zu studieren [Takata (1936)]. Weil ich bei dieser Untersuchung einen befreiedigenden Erfolg erhielt, so habe ich weiter untersucht, ob ich diese Methode auch auf die Bestimmung der Blutfettstoffe anwenden könnte.

Da bei der Bestimmung der Fettstoffe die Extraktionsmethode eine grosse Rolle spielt, habe ich nämlich einerseits die Endo'sche Bestimmungsmethode der Gewebsfettstoffe (1928) auf die der Blutfettstoffe angewandt, weil diese Methode für meine Untersuchungen an den Gewebsfettstoffen sich als die beste erwiesen hatte, andererseits die von mir etwas veränderte Bloor'sche Methode (Alkohol-Äther-Mischung 1:1) gebraucht, und darauf diese beiden Methoden verglichen.

Die zu bestimmenden Fettstoffe sind Gesamtfettsäure, Cholesterin und Phosphatid.

I. Extraktion der Fettstoffe.

Endo'sche Methode (1928): Man bringt 1 ccm Blut oder Serum in einen Porzellanmöser, dazu Schmirgel von ca. zweifacher Quantität und ein wenig Alkohol. Man zerreibt dieses und zerstört dadurch die durch Alkohol sich absetzende Bluteiweissmasse. Dann fügt man ca. 5 ccm Alkohol-Äther (1:1) hinzu und mischt alles gut, wodurch die Fettstoffe aus der Masse in den Alkohol-Äther über-

gehen. Dann bringt man das Ganze in einen Meyerkolben, erwärmt bis zu schwachem Sieden des Inhalts auf Wasserbad, kühlt ab und filtriert, und das Filtrat ist zu bestimmen.

Bloor'sche Methode (1922): Ich gebrauchte eine Alkohol-Äther-Mischung von 1:1, anstatt 3:1 Bloor'scher Angabe. Man bringt ca. 20 ccm Alkohol-Äther in einen Meyerkolben (Inhaltsvolumen 50–100 ccm). Dann lässt man 1 ccm Blut oder Serum in den Kolben tropfen, indem man immer schüttelt. Hierauf erwärmt man bis zu schwachem Sieden des Inhalts auf Wasserbad, kühlt ab, filtriert und bestimmt dann.

II. Bestimmung der Fettstoffe.

Ich bestimmte alle Blutfettstoffe (d. h. Fettsäure, Cholesterin und Phosphatid) immer bei den Extrakten sowohl nach Endo'scher Extraktionsmethode wie auch nach Bloor'scher. Die Bestimmungsmethode war ganz nach dieselbe wie die meine bei Geweben [Takata (1936)].

a) Bestimmung der Gesamtfettsäure.

Man tut eine gewisse Menge der Extraktionsflüssigkeit von Alkohol-Äther in einen Meyerkolben. Nach Abdampfen des Äthers auf dem Wasserbad verseift man durch ca. 5 ccm NaOH (20%) bis zum Verschwinden des Alkohol-Geruchs. Dann giesst man die warme Flüssigkeit in einen Mikroflüssigkeitsextraktor, spült den Meyerkolben 4–5 mal mit einer kleinen Menge heissen Wassers aus, giesst auch das Spülwasser in den Extraktor und säuert mit Salzsäure, extrahiert nun mit Äther und dampft den Äther ab, extrahiert den Rückstand mit Reinäther, filtriert durch Asbestfilter in den Meyerkolben, dampft den Äther ab und trocknet den Rückstand 1 Stunde lang bei 50°C, fügt ca. 5 ccm Petroläther (Siedepunkt unter 50°C), bevor er kühl wird, hinzu und verkorkt während einer Stunde, filtriert durch Asbestfilter in einen Becher (Inhaltsvolumen ca. 20 ccm), dessen oberer Rand geschliffen ist, spült den Meyerkolben mit Petroläther einige Male aus, giesst auch die Spülflüssigkeit in den Becher, dampft den Petroläther ab, trocknet 1 Stunde lang bei 50°C, kühlt in einem Exsiccator ab und wägt. Die

Gesamtfettsäuremenge in 1 ccm Blut und 1 ccm Serum des Kaninchens sowohl nach Endo'scher als auch nach Bloor'scher Extraktionsmethode ist aus Tab. I. ersichtlich.

Tabelle I.

	Gesamtfettsäure (mg)			
	Vollblut (1 ccm)		Serum (1 ccm)	
Kaninchen / Extraktion	1	2	3	4
nach Endo	0,8	1,4	1,0	1,6
		2,0		1,4
	0,6	1,3	1,0	1,4
„ Bloor	0,8	1,4	1,0	1,5
		1,2		1,4
	0,6	1,6	1,0	1,4

b) Bestimmung des Cholesterins.

Gewebe hat fast nur freies Cholesterin. Das Blut enthält aber nicht nur freies Cholesterin, sondern auch eine mehrere Menge Cholesterinester.

Gesamtcholesterins: Man tut eine gewisse Menge Alkohol-Äther-Extraktionsflüssigkeit in einen Meyerkolben und dampft diese ab; dazu fügt man ca. 10 ccm Alkohol und ca. 2 ccm Natrium-Alkoholat (2%) und verseift dies ca. 2 Stunden lang auf Wasserbad im Grad schwachen Siedens des Inhalts, kühlt es ab, giesst es in einen Mikroflüssigkeitsextraktor über, spült den Kolben einige Male mit einer Menge Äther und dann einige Male mit Wasser aus, giesst auch das Spülwasser in den Extraktor, extrahiert mit Äther auf Wasserbad, giesst die Extraktionsflüssigkeit in einen Becher, dampft den Äther ab und extrahiert den Rückstand mit kleiner Menge Aceton einige Male, filtriert durch einen mit Watte verstopften kleinen Trichter in ein Zentrifugierglas (Inhaltsvolumen ca. 30 ccm), vermehrt das Ganze auf 8 ccm durch Zugabe von Aceton und fügt noch 2 ccm Wasser hinzu, damit die Konzentration

des Acetons 80% wird. Man erwärmt dann alles 5 Minuten lang bei 50–60°C und fügt 0,2–0,5 ccm Digitonin-Alkohollösung (1%), die schon vorher auf dieselbe Temperatur erwärmt wurde, hinzu. Man mischt es zusammen, kühlt das Ganze bis auf Zimmertemperatur ab und filtriert es durch einen Jenaglasfilter (10 G, 3) der Zeiss-Werke. Dann spült man diesen Niederschlag mit Aceton, darauf mit Äther, trocknet eine Stunde lang bei 100°C, kühlt im Exsiccator ab und wägt: Gewicht des Niederschlags÷4,11 = Gewicht des Gesamtcholesterins. Das Resultat ist aus Tab. II zu ersehen.

Tabelle II.

Extraktion \ Kaninchen	Gesamtcholesterin (mg)			
	Vollblut (1 ccm)		Serum (1 ccm)	
	5	6	7	8
nach Endo	0,78	0,78	0,37	0,39
	0,73	0,79	0,39	0,34
	0,78	0,79	0,39	0,34
„ Bloor	0,78	0,80	0,39	0,37
	0,73	0,77	0,39	0,34
	0,78	0,78	0,39	0,34

Freies Cholesterin: Man giesst die Alkohol-Äther-Extraktionsflüssigkeit in einen Becher über, dampft ab, extrahiert den Rückstand mit Aceton, filtriert in Zentrifugierglas, vermehrt die Menge bis auf 8 ccm, fügt 2 ccm Wasser hinzu, verbindet dies mit Digitonin bei 50–60°C, kühlt ab, filtriert, spült den Rückstand mit Aceton, dann mit Äther aus, kühlt ab und wägt.

Gebundenes Cholesterin: Wenn man durch oben erwähntes Verfahren Digitonid des freien Cholesterins macht, bleiben noch Cholesterinester sowohl in der Filtrierflüssigkeit als auch in der Spülflüssigkeit zurück. Deshalb dampft man daraus Aceton und Äther ab, fügt dem Rückstand Alkohol und Natrium-Alkoholat hinzu, verseift diesen Ester, giesst alles in einen Flüssigkeitsex-

traktor über, extrahiert mit Äther, dampft den Äther ab, gibt dem Rückstand Aceton bei, fügt hier Digitonin hinzu und erhält Digitonid des Cholesterins. Die Ergebnisse zeigt Tab. III.

Tabelle III.

	Freies Cholesterin		Gebundenes Cholesterin	
	Vollblut (1 ccm)	Serum (1 ccm)	Vollblut (1 ccm)	Serum (1 ccm)
Kaninchen / Extraktion	9	10	11	12
nach Endo	0,46	0,21	0,30	0,20
	0,48	0,17	0,28	0,23
	0,43	0,18	0,28	0,22
„ Bloor	0,44	0,18	0,32	0,19
	0,49	0,17	0,29	0,24
	0,44	0,20	0,29	0,22

c) *Bestimmung des Phosphatids.*

Da man den Aminostickstoff der Fettstoffe 1 ccm Blutes nicht mit meiner Bestimmungsmethode bei den Geweben bestimmen kann wass beweist, dass die Menge des Kephalins im Blut sehr gering ist, gebrauchte ich meine Bestimmungsmethode der Gewebsfettstoffe für die Bestimmung des Phosphatidphosphors im Blut, deren Umriss, wie folgt, ist: Man tut Alkohol-Äther-Extraktionsflüssigkeit in einen Kjeldahlkolben, dampft den Alkohol-Äther bei niedrigem Druck und niedriger Temperatur ab, extrahiert den Rückstand mit reinem Äther, filtriert in einen andern Kjeldahlkolben durch einen Asbestfilter, dampft den Äther ab, oxydiert mit konz. Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure und neutralisiert mit NaOH (20%). Durch Hinzufügen von Ammoniummolybdat, Ammoniumnitrat und Salpetersäure erhält man einen Niederschlag von Phosphorammoniummolybdat. Dann filtriert man und spült den Niederschlag mit Kaliumnitrat-Lösung aus bis zum Verschwinden der sauren Reaktion der Spülflüssigkeit. Den Niederschlag giesst man zusammen mit dem Filtrierpapier,

in einen Becher über, löst dies in NaOH ($n/25$) auf und durch die Titrierung der überschüssigen Natronlauge mit HCl ($n/25$) bestimmt man das Volumen des $n/25$ NaOH, das man zum Lösen des Niederschlags gebraucht hat; dessen Resultat × Faktor (0.054) = Menge des Phosphors.

Der grösste Teil dieses Phosphors ist der Lecithinphosphor. Den Phosphatidphosphor im Blut und Serum ersieht man aus Tab. IV.

Tabelle IV.

Extraktion	Phosphatidphosphor	
	Vollblut (1 ccm)	Serum (1 ccm)
Kaninchen	13	14
nach Endo	0,028	0,016
	0,028	0,018
	0,027	0,014
„ Bloor	0,028	0,017
	0,032	0,017
	0,033	0,016

Zusammenfassung.

Nach meiner Feststellung bei den oben erwähnten Untersuchungen kann ich Folgendes sagen:

1. Auf die Extrahierung der Blutfettstoffe mit Alkohol-Äther hat die Masse des dabei durch Alkohol entstehenden Bluteiweisses keinen Einfluss, wenn man so vorsichtig vorgeht wie bei der Bloor'schen Methode. Also ist die Bloor'sche Methode für die Extraktion der Blutfettstoffe die beste, weil ihre Handhabung sehr einfach ist.

2. Die Fettstoffe im Blut des Kaninchens.

Der Vergleich zwischen den Resultaten vieler Forscher und dem meiner Untersuchungen über die Bestimmung der Blutfettstoffe beim normalen Kaninchen ist aus Tab. V zu ersehen.

Tabelle V.
Fettstoffe im Vollblut.
Gesamtfettsäure.

Forscher	Takahata	Kohno	Shimizu	Takata
Extraktions-methode	Bang	Bloor	Suto	Bloor
Bestimmungs-methode	Nephelometrie	Nephelometrie	Nephelometrie	Gravimetrie
Wert (%)	0,159–0,210	0,307–0,547	0,274–0,390	0,12–0,20

Gesamtcholesterin.

Frorscher	Takahata	Kohno	Shimizu	Takaki	Takata
Extraktions-methode	Bang	Bloor	Bloor	Verbesserte Leiboffsche Methode	Bloor
Bestim-mungs-methode	Colorimetrie	Colorimetrie	Colorimetrie	Colorimetrie	Digitonin-Methode
Wert (%)	0,090–0,125	0,100–0,183	0,063–0,087	0,064–0,086	0,073–0,080

Phosphatidphosphor.

Forscher	Takahata	Sueyoshi	Takata
Extraktions-methode	Bang	Bloor	Bloor
Bestimmungs-methode	Colorimetrie	Colorimetrie	Titrimetrie
Wert (%)	0,0034–0,0045	0,0018–0,0035	0,0027–0,0033

Gesamtfettsäure: Takahata'sche Methode (1926): Das Minimum ist ein wenig grösser als mein Minimum. Das Maximum liegt nahe bei dem meinigen. Kohno'sche (1929) und Shimizu'sche (1935) Methode: Das Minimum ist grösser als mein Maximum und der Wert schwankt sehr. Der Grund, warum der Wert von Kohno und Shimizu viel grösser als bei mir ist und sehr schwankt, mag viel mehr in der Unvollkommenheit der Bestim-

mungsmethode als in der Extraktionsmethode liegen. Auch wenn man nach Verseifung der Blutfettstoffe sehr genau neutralisiert, wird noch einwenig Fettsäure frei. Die Teilchen dieser Fettsäure treten in die Fettsäure-Emulsion ein, welche entsteht, wenn man die Seife ansäuert und die ganze Fettsäure frei macht. Die Gleichmässigkeit der Emulsion wird dadurch gestört, und wohl sicher schwankt der Wert beim nephelometrischen Vergleich mit der Standardlösung. Takahata (1926) löste die Seife der aus Blut extrahierten Fettstoffe in Wasser und machte dann durch Säure Fettsäure frei. Deshalb ist die Grösse der daraus entstehenden Teilchen dieselbe und demnach ist der Wert verhältnismässig konstant. Die Bildungsweise der Emulsion hat bei der Nephelometrie auf das Resultat einen grossen Einfluss und noch weiter ist die Vergleichung der Trübung immer schwerer, wenn dabei die Extraktionsflüssigkeit durch die Farbstoffe gefärbt ist. Wegen solcher Ursachen erzielt man mit der Gravimetrie den besseren Wert.

Gesamtcholesterin: Shimizu'sche Methode (1935) und Takaki'sche Methode (1936): Das Minimum ist ein wenig kleiner als das meinige und das Maximum ein wenig grösser als bei mir. Takahata'sche Methode (1926) und Kohno'sche Methode (1929): Sogar das Minimum ist grösser als mein Maximum.

Bei der Extraktion des Cholesterins aus Blut gibt es oft in diesem Extrakt auch Farbstoff. Deshalb erzielt man schwer denselben Farbenton wie den der Standardflüssigkeit und dazu ist der Farbenton im allgemeinen noch sehr veränderlich. Da wegen solcher Ursachen das Resultat bei der Colorimetrie im allgemeinen schwankt, so sollte man bei der Bestimmung des Cholesterins, besonders bei einer kleinen Menge die Digitoninmethode anwenden. Hier empfehle ich daher die von Heki verbesserte Digitoninmethode.

Phosphatidphosphor: Sueyoshi'sche Methode (1934): Das Minimum ist kleiner als das meinige, und das Maximum ein wenig grösser als bei mir. Takahata'sche Methode (1926): Das Minimum ist grösser als mein Maximum. Der Grund, warum der Wert bei der Colorimetrie des Phosphatidphosphors im allgemeinen grösser ist und warum das Resultat so schwankt, ist vielleicht derselbe wie

bei der Colorimetrie des Cholesterins. In diesem Laboratorium wurde diese Tatsache häufig beobachtet; in den meisten Fällen zeigte die Colorimetrie nach Bell und Doisy (1920) den höheren Wert als den bei Titrimetrie. Deshalb ist auch bei der Bestimmung des Phosphatidphosphors die von mir verbesserte Titrimetrie, viel passender als die Colorimetrie.

Nach meiner Bestimmungsmethode sind.

a) in 1 ccm Blut des Kaninchens: 0,8–2 mg Gesamtfettsäure, 0,7–0,9 mg Gesamtcholesterin, 0,4–0,5 mg freies Cholesterin, mehr oder weniger als 0,3 mg gebundenes Cholesterin, mehr oder weniger als 0,03 mg Phosphatidphosphor;

b) in 1 ccm Serum des Kaninchens: 1–1,6 mg Gesamtfettsäure, mehr oder weniger als 0,4 mg Gesamtcholesterin, mehr oder weniger als 0,2 mg freies Cholesterin, mehr oder weniger als 0,2 mg gebundenes Cholesterin, mehr oder weniger als 0,015 mg Phosphatidphosphor.

LITERATUR.

Bell and Doisy (1920): J. biol. Chem., **44**, 55.
Bloor, Pelkan and Allen (1922): J. biol. Chem., **52**, 191.
Endo (1928): J. of Jüzen med. Soc., **33**, 1892.
Kohno (1929): Fol. endocrinol. jap., **4**, 1796.
Shimizu (1935): Hokkaido med. J., **13**, 1265.
Sueyoshi und Okonogi (1934): J. of Biochem., **19**, 489.
Takahata und Nakamura (1926): Fukuoka Acta Medica., **19**, 398.
Takaki (1936): Mitt. der med. Ges. zu Nagoya, **43**, 575.
Takata (1936): J. of Biochem., **24**, 153.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHEN FERMENTE DER PANKREASDRÜSE DES KANINCHENS.

II Mitteilung: Über die proteolytischen Fermente des Pankreassaftes.

Von

FUYUTAROO ITZIOKA.

(*Aus dem Utziono-Laboratorium des Institutes für Chemie an der Kaiserlichen Universität Kyoto*).

(Eingegangen am 17. August 1936)

Die neuen Ergebnisse betreffs der Eigenschaften sowie der Spezifität der Pankreasproteasen (1928) und ebenso die Darstellung des Krystall-Trypsins (1933) sind an dem Extrakt der Pankreasdrüse gewonnen worden; nach den älteren Angaben von E. Fischer (1905) und den Ausführungen von E. Abderhalden (1925) ist aber nur vereinzelt ein weniges über die Wirkung des Sekretsaftes der Pankreasdrüse selbst berichtet worden, deren Kenntnis aber vom physiologisch-chemischen wie auch vom vergleichend physiologischen Standpunkt aus nicht entbehrt werden kann.

E. Waldschmidt-Leitz und J. Waldschmidt-Graser (1927) haben ihrer Zeit darauf aufmerksam gemacht, dass kein qualitativer Unterschied zwischen den fermentativen Wirkungen des Fistelsaftes und denjenigen des Drüsenauszuges des Hundepunkreas beobachtet wurde, obgleich die Erepsinwirkung des Saftes auch gegenüber der Trypsinwirkung deutlich niedriger steht.

Im Jahre 1933 haben Le Breton und F. Mocoroa (1933) das Vorhandensein eines inaktiven Trypsins (durch Kinase aktivierbar) und einer aktiven Carboxypolypeptidase (Spaltung von Chloracetyl-*l*-Tyrosin, Clupein und Scambrin) im Pankreassaft des Hundes bestätigt, dagegen weder Dipeptidase noch Aminopolypeptidase festgestellt.

Anschliessend an meine diesbezügliche I. Mitteilung (1936)

Tabelle I.
Eiweissspaltung durch den

Aciditätszunahme in 4 ccm

Substrate (20 ccm)	Pankreassaft (Verdünnung, Aktivierung, Menge)	Zeit (Stunden)	pH 4.0	pH 5.0	pH 5.5
Cascin (1%)	Saft (1:20) Kinasepulver 0.05 g 4 ccm	2 4 24	0.02 (4.0) 0 (4.0) 0 (4.0)	0.04 (5.0) 0.04 (5.0) 0.04 (5.0)	−0.01 (5.5) 0.25 (5.5) 0.56 (5.5)
	Saft (1:20) ohne Kinase 2 ccm	8 24 72	—	—	—
	Saft (1:20) Cystein (1/20 Mol) 2 ccm	8 24 72	—	—	—
Casein (2%)	Saft (1:10) Kinasepulver 0.05 g 3 ccm	1	—	—	—
Glycinin (%)	Saft (1:20) Kinasepulver 0.05 g 4 ccm	3 8 24	—	0 0.09 0.24	0 0.13 0.33
	Saft (1:20) ohne Kinase 4 ccm	3 8 24	—	—	—
Gelatine (1%)	Saft (1:20) Kinasepulver 0.05 g 4 ccm	2 4 24	0 (4.0) 0 (4.0) 0 (4.0)	0 (5.0) 0 (5.0) 0.04 (5.0)	−0.03 (5.5) 0 (5.5) 0.08 (5.5)
Gelatine (3%)	Saft (1:10) Kinasepulver 0.05 g 3 ccm	1	—	—	—
Gelatine (1%)	Saft (1:20) ohne Kinase 4 ccm	5 24 72	—	—	—

Pankreassaft des Kaninchens.

Digestionslösung (ccm 0.1 n-NaOH)					
6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
0.11 (6.0) 0.42 (6.0) 0.91 (6.0)	0.08 (6.7) 0.40 (6.8) 0.86 (6.8)	0.08 (7.0) 0.33 (7.1) 0.85 (7.1)	0.06 (7.5) 0.26 (7.5) 0.79 (7.7)	0.06 (8.1) 0.26 (7.8) 0.72 (7.9)	0.06 (8.4) 0.26 (8.0) 0.72 (8.0)
0 (6.3) 0 (6.4) 0 (6.4)	—	0 (7.0) 0.05 (7.0) 0.29 (7.0)	—	-0.01 (8.0) 0.01 (8.0) 0.04 (8.0)	—
0 (6.3) 0 (6.5) —	—	0 (7.0) 0.04 (7.2) 0.25 (7.2)	—	0.01 (8.1) 0.04 (8.0) 0.15 (.82)	—
0.11 (6.0)	0.27 (6.7)	0.30 (7.2)	0.31 (7.8)	—	—
0.02 (6.0) 0.28 (9.0) 0.49 (6.0)	0.04 (6.7) 0.35 (6.7) 0.49 (6.7)	0.04 (7.2) 0.29 (7.0) 0.39 (7.2)	0.02 (7.5) 0.27 (7.5) 0.32 (7.7)	0.02 (8.0) 0.22 (7.8) 0.27 (8.0)	—
—	—	—	0.02 (7.5) 0.06 (7.6) 0.07 (7.6)	—	—
0.02 (6.0) 0.07 (6.0) 0.26 (6.0)	0.02 (6.5) 0.11 (6.5) 0.35 (6.5)	0.07 (7.0) 0.42 (7.0) 0.45 (7.0)	0.09 (7.5) 0.23 (7.3) 0.41 (7.3)	0.05 (8.0) 0.19 (7.8) 0.40 (7.8)	0.05 (8.4) 0.16 (8.2) 0.33 (8.2)
0.08 (6.0)	0.13 (6.4)	0.15 (7.0)	0.17 (7.5)	—	—
—	—	—	0.01 (7.5) 0.07 (7.5) 0.07 (7.5)	—	—

werden hier die Untersuchungen mit dem Pankreassaft des Kaninchens unter Leitung von Prof. S. Utzino unter Berücksichtigung dieser neuen Erkenntnisse in Angriff genommen.

Der frische Pankreassaft des Kaninchens greift weder Casein, Gelatine noch Glycinin (wenigstens nicht in 24 Std.) an, während der Mazerationssaft der Pankreasdrüse schon eine aktive Trypsinwirkung aufweist, wie dies in der I. Mitteilung gezeigt werden konnte (Tabelle I). Nach der Aktivierung des Saftes mit der Kinase der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens werden diese Eiweissstoffe deutlich hydrolysiert.

Wie es schon bei dem Mazerationssaft der Fall war, wurden Casein und auch Glycinin bei schwach saurer Reaktion (P_H 6.0–6.5) deutlich gespalten, während die Gelatine-Hydrolyse hauptsächlich bei alkalischer Reaktion stattfand (P_H 7.0–8.0), was mit den Ergebnissen von E. Waldschmidt-Leitz (1924) gut übereinstimmt. Hier ist noch zu erwähnen, dass eine starke Casein-Hydrolyse durch Schweinepankreaspulver auch bei der schwach sauren Reaktion (P_H 6.5) auftrat. Falls die Versuche aber mit einer stärkeren Enzymlösung und mit einer stärkeren Casein-Konzentration (2%) angestellt wurden, fand die maximale Aciditätszunahme in der Hauptsache bei alkalischer Reaktion (P_H 7.0–7.5) statt.

Diesen Ergebnissen nach darf man wohl mit Recht annehmen, dass die Resultate in bezug auf die Optimalreaktion der Trypsinwirkung von der Proteinnatur und von der Konzentration des Substrates sowie des Enzyms abhängig sein dürften.

Eine geringfügige Aciditätszunahme im Versuch mit dem nicht aktivierten Safte nach einer längeren Digestionsdauer (72 Std.) dürfte sich durch die Selbstaktivierung des Trypsins erklären. Diese Tatsache spricht übereinstimmend dafür, dass man hier in bezug auf die Vollaktivität des Pankreasmazerationssaftes eine eigene Aktivierungsweise des Pankreastrypsins bei der Bereitung des Glycerinextraktes annehmen muss, so wie denn auch das Vorhandensein der Kinase in der Pankreasdrüse schon nach vielen Seiten hin anerkannt ist. Ein Cystein-Zusatz (1/20 Mol) übte keinen aktivierenden Einfluss auf den Pankreassaft aus. Nach

diesen Ergebnissen dürfte hier auch die Kathepsinwirkung auszuschliessen sein. Die erwähnten Resultate stimmen mit der Feststellung von Le Breton und F. Mocoroa (1933), dass der reine Pankreassaft des Hundes inaktives Trypsin enthält, gut überein. Es muss noch gesagt werden, dass Ovo- und Eieralbumin (E. Merck), ebenso wie beim Mazerationssaft der Pankreasdrüse, eine starke Resistenz gegen den Pankreassaft des Kaninchens aufwies (Tabelle II).

Tabelle II.

Eiweissspaltung durch den Pankreassaft des Kaninchens (PH 7.5–8.0)

Pankreassaft (Verdünnung, Aktivierung, Menge)	Substrate / Zeit (Stunden)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 n-NaOH)				
		Casein	Methyliertes Casein	Caseino-Pepton	Ovo-albumin (E. Merck)	Serum-albumin (E. Merck)
Saft (1:10) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	0.70 (7.8)	0.25 (7.8)	0.32 (7.4)	−0.04 (7.6)	−0.01 (7.6)
	24	0.80 (7.8)	0.37 (8.0)	0.52 (7.3)	0.01 (7.4)	−0.01 (7.5)
	72	0.99 (8.1)	0.37 (8.1)	0.62 (7.4)	0.13 (7.4)	0.01 (7.5)
Saft (1:10) ohne Kinase 4 ccm	5	0.03 (7.8)	0 (7.8)	0.04 (7.8)	0.01 (8.0)	—
	24	0.05 (7.8)	0 (8.0)	0.10 (7.6)	0.01 (7.6)	
	72	0.19 (8.0)	−0.01 (8.1)	0.13 (7.6)	0.02 (7.6)	
Saft (1:5) ohne Kinase 4 ccm	5	0.02 (7.8)	—	0.06 (8.0)	—	—
	24	0.03 (8.0)		0.15 (7.9)		
	72	0.14 (8.0)		0.35 (7.8)		

Die Feststellung von T. Imai (1924), dass das Bedecken der freien Aminogruppe mittels einer gewissen chemischen Gruppe eine Resistenzzunahme im Eiweissmolekül gegenüber der Proteinasen-Wirkung hervorrufen kann, bestätigte sich hier dadurch, dass die Spaltung des methylierten Caseins durch den Pankreassaft im Vergleich zur Caseinhydrolyse einen niedrigeren Wert zeigte.

Das Caseino-Pepton, das aus dem Caseindigestat mittels der bis zur Konstanz des Aciditätszuwachses fortgesetzten Pepsinwirkung (Schweinemagenschleimhaut) durch Zusatz von Aceton ausgefällt wurde und bei $SO_4(NH_4)_2$-Sättigung fast keine Aus-

fällung mehr gab, wurde schwach durch den unaktivierten, deutlicher durch den aktivierten Saft hydrolysiert.

Im Gegensatz zu E. Waldschmidt-Leitz (1927), der eine Erepsinwirkung im Hundepankreassaft, wenn auch geringeren Grades beobachtete, wurde von mir keine Erepsinwirkung im Kaninchenpankreassaft festgestellt, da die Dipeptide und Tripeptide weder durch den frischen noch aktivierten Saft angreifbar waren, während der Mazerationssaft der Pankreasdrüse die Peptide mehr oder weniger zu hydrolysieren vermochte (Tabelle III).

Tabelle III.

Dipeptide- und Tripeptide-Spaltung durch den Pankreassaft des Kaninchens.

Substratlösung (0.05 Mol-Lösung) 20 ccm	Pankreassaft (Verdünnung Menge)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 n-NaOH)					
		Zeit (Stunden)	pH				
			6.0	7.0	7.5	8.0	8.5
Glycylglycin	Saft(1:20) 4 ccm	5	—	—	—	—	0 (8.3)[1]
		24	0.01 (6.0)	0.01 (7.0)	—	0.03 (8.0)	−0.04 (8.4)
		72	—	—	—	—	−0.04 (8.2)
Glycyl–l phenylalanin	Saft(1:20) 4 ccm	5	—	—	0.05 (7.5)[1]	—	—
		24	0 (6.0)	0.07 (7.0)	0.05 (7.5)	−0.01 (8.0)	—
		72	—	—	0.04 (7.7)	—	
dl-Leucylglycin	„	5	—	—		—	0 (8.3)[1]
		24	0 (6.0)	0 (7.0)	—	−0.02 (7.8)	−0.04 (8.4)
		72	—	—		—	−0.04 (8.2)
dl-Leucylglycylglycin	Saft(1:10) 4 ccm	5			0.02 (7.4)		
		24	—	—	−0.01 (7.4)	—	—
		72			−0.03 (7.5)		
	Saft(1:10)[2] Kinaselösung 4 ccm	5	0 (5.8)	0 (6.8)		0 (7.8)	
		24	0 (5.7)	0 (6.7)	—	0 (8.0)	—
		72	0 (5.7)	0 (6.7)		0 (8.0)	
dl-Leucylglycylphenylalanin (β)	Saft(1:10) 4 ccm	5			0.04 (7.5)		
		24	—	—	0.02 (7.6)	—	—
		72			0.01 (7.7)		

1) Der Saft wurde mit Wasser aufs 10fache verdünnt.
2) 1 ccm Saft wurde mit 4 ccm Wasser verdünnt und mit 5 ccm Kinaselösung bei 37° 30 Min. stehen gelassen.

Obgleich man die Verschiedenheit der Tierart als verantwortlich für diesen Spezifitätsunterschied in Betracht ziehen muss, verdient diese Beobachtung doch besondere Beachtung, da nach der Beschreibung der deutschen Forscher eine Verunreinigung des Pankreassaftes durch geringere Mengen Darmsekret keineswegs ausgeschlossen war.

Mit grosser Wahrscheinlichkeit kann hier geschlossen werden, dass für die Peptidase-Wirkung des Mazerationssaftes des Kaninchens die Gewebspeptidase, die bei der Mazeration mitgefasst wurde, verantwortlich ist.

Was die Acylase (Carboxypolypeptidase) (1928) anbetrifft, wurden weder Benzoyl- noch Phtalyldipeptide durch den Pankreassaft (auch aktiviert) angegriffen, wie dies die Ergebnisse mit dem Mazerationssaft schon voraussehen liessen (Tabelle IV). Von den Halogenacylaminosäuren oder Halogenacyldipeptiden ist der Saft nur Chloracetylaminosäuren zu spalten fähig (Tabelle V). Die Hydrolyse des Chloracetyl-*l*-phenylalanins wurde durch Zusatz von Kinasepulver nicht merkbar verstärkt. Man möchte also annehmen, dass im Pankreassaft des Kaninchens sich Halogenacylase (1929) vorfindet, deren Wirkung auch auf gewisse Chloracetylaminosäuren eingestellt ist.

Hier sei noch erwähnt, dass die beiden Halogenacyldipeptide durch den Mazerationssaft gespalten wurden, durch den Saft aber nicht.

Experimenteller Teil.

Pankreassaft: Durch Einführung einer kleinen Kapillarglaskanüle in den Ductus pankreaticus einige mm vor seiner Mündung im Dünndarm wurde der Pankreassaft aufgenommen. Unter günstigen Bedingungen gelang es mir, nach dem Einspritzen einer Sekretinlösung sogar einige bis 10 ccm des klaren Saftes im Probierglas anzusammeln. Beim Sehen durch das zwischen den Fingern aufgespannte Peritoneum in der Nähe der Dünndarmschlinge kann man den Verlauf des Ausführungsganges ohne Schwierigkeit ausfindig machen und verfolgen. Für die Aktivierung wurden je 20 ccm des aufs 20 fache verdünnten Saftes

Tabelle IV.
Acylpeptide-Spaltung durch den Pankreassaft des Kaninchens.

Substratlösung (0.05 Mol-Lösung) 20 ccm	Pankreassaft (Verdünnung, Aktivierung, Menge)	Zeit (Stunden)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 n-NaOH) pH 5.0	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0
Benzoylglycin	Saft(1:20) Kinasepulver 0.05 g, 2 ccm	5	0 (5.0)	0 (6.0)	0 (7.0)	—	0 (8.0)	0 (9.0)
		24	0 (5.0)	0 (6.0)	0 (7.0)		0 (8.0)	0 (9.0)
		72	0 (5.0)	0 (6.0)	0 (7.0)		0 (8.0)	0 (9.0)
Benzoyldiglycin	Saft(1:20) Kinasepulver 0.10 g, 4 ccm	5	0 (5,0)	0 (6.0)	−0.03 (7.0)	0 (7.5)	−0.05 (8.0)	−0.05 (8.6)
		24	0 (5.0)	−0.01 (6.0)	0.01 (7.0)	0 (7.5)	−0.02 (8.0)	−0.05 (8.4)
		72	0.03 (5.0)	−0.05 (6.0)	0.01 (7.0)	0 (7.5)	0.02 (8.0)	−0.01 (8.4)
Benzoyl-dl-Leucylglycin	Saft(1:20) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	—	—	—	0 (7.5)	—	—
		24				0.01 (7.5)		
		72				0.01 (7.5)		
Phtalydiglycin	Saft(1:10) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	—	—	0.07 (6.8)	—	—	—
		24			0.10 (6.5)			
		72			0.11 (6.5)			

TABELLE V.

Halogenacylpeptide-Spaltung durch den Pankreassaft des Kaninchens.

Substratlösung (0.05 Mol-Lösung) 20 ccm	Pankreassaft (Verdünnung, Aktivierung, Menge)	Zeit (Stunden)	NH_2-N-Zunahme in 1 ccm Digestionslösung (mg NH_2-N) pH 6.0	pH 7.0–7.5	pH 8.0
Chloracetyl-l-Phenylalanin	Saft(1:10) ohne Kinase 4 ccm	5	—	0.263 (7.5)	—
		24		0.288 (7.5)	
		72		0.287 (7.5)	
	Saft(1:10) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	—	0 304 (7.5)	—
		24		0.302 (7.5)	
		72		0.308 (7.5)	
	Saft(1:5) Kinase 0.02 g (30 Min. erhitzt) 4 ccm	5	—	−0.001 (7.5)	—
		24		−0.028 (7.3)	
		72		−0.011 (7.3)	
Chloracetyl-dl-Phenylalanin (β)	Saft(1:10) ohne Kinase 4 ccm	5	—	−0.003 (7.4)	—
		24		−0.003 (7.2)	
		72		0.001 (7.2)	
	Saft(1:5) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	—	0.019 (7.5)	—
		24		0.019 (7.4)	
		72		0.016 (7.4)	
	Saft(1:5) Kinase 0.02 g (30 Min. erhitzt) 4 ccm	5	—	−0.018 (7.4)	—
		24		−0.003 (7.3)	
		72		−0.012 (7.3)	
Chloracetyl-l-Tyrosin	Saft(1:10) Kinasepulver 0.05 g, 2ccm	5	—	0.046 (7.4)	—
		120		0.050 (7.4)	
Chloracetyl-diglycin	Saft(1:10) ohne Kinase 4 ccm	5	0.011 (6.0)[1]	0.001 (7.2)	−0.006 (7.9)[1]
		24	0.006 (6.0)	0.001 (7.1)	−0.004 (7.6)
		72	−0.005 (6.0)	0.001 (7.2)	−0.016 (7.6)
	Saft(1:10) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	—	0 (7.2)	—
		24		0 (7.0)	
		72		0 (7.2)	
Bromisocapronyl-glycin	Saft(1:20) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	−0.003 (6.0)	−0.004 (6.8)	−0.001
		24	0.001 (5.8)	−0.003 (6.7)	−0.001
		72	−0.020 (5.8)	−0.020 (6.7)	−0.014
Bromisocapronyl-glycylglycin	Saft(1:20) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	5	—	0 (7.0)	−0.001 (7.4)
		24		−0.002 (7.0)	0 (7.4)
		72		0.023 (7.0)	0.014 (7.4)
Casein (1%)	Saft(1:20) Kinasepulver 0.05 g, 4 ccm	6	—	—	0.36[2]
		24			0.62
		72			0.82

1) 1 ccm Pankreassaft, aufs 5-fache verdünnt, wurde mit 5 ccm Kinaselösung behandelt und 4 ccm dieser Lösung gebraucht.

2) Aciditätszunahme in 4 ccm Digestinslösung (ccm 0.1 *n*-NaOH) angegeben.

(auch 5–10 fach verdünnt) mit je 0.05 g Kinasepulver oder je 10 ccm des aufs 10 fache verdünnten Saftes mit je 10 ccm Kinaselösung (1928) 30 Min. bei 37° behandelt. Die Kinasepräparate sind wie in der I. Mitteilung hergestellt worden und zeigten in der angegebenen Konzentration weder eine tryptische noch ereptische Wirkung.

Digestionsansatz: Als Hauptversuch wurden je 20 ccm einer 1%igen Eiweisslösung (Casein oder Glycinin in 0.4% Sodalösung) oder je 20 ccm einer 1/20 Mol Peptidlösung (Acylderivate als Na-Salz in der berechneten Menge 0.1 *n*-NaOH Lösung) in Citratpuffer von verschiedenem P_H-Werte unter Zusatz von 2–4 ccm verdünnter Pankreassaftlösung (meistens 20 fach, aber auch 5–10 fach verdünnt) und etwas Toluol bei 37° digeriert. In 4 ccm dieser Digestionslösung wurde die Aciditätszunahme nach Sörensen titriert oder die NH_2-N Zunahme in 1 ccm nach Van Slyke bestimmt.

Bei der Eiweisshydrolyse wurden die P_H-Werte durch die Gasketten-Methode bestimmt.

Als Kontrollversuch wurden Versuche mit Fermentlösung ohne Substrat unter den gleichen Bedingungen angestellt.

Die hier erhaltene Aciditäts- oder NH_2.N-Zunahme wurde als Kontrolle vom Betrag des Hauptversuchs abgezogen. In den Tabellen sind diese kontrollierten Zahlen angegeben.

Die Zahlen in den Klammern geben die bei allen Bestimmungen geprüften P_H-Werte an.

Zusammenfassung.

1. Der frische Pankreassaft des Kaninchens greift Eiweisskörper (Casein, Gelatine und Glycinin) nicht an, er greift sie sofort an, wenn er mit Kinase (Dünndarmschleimhaut) aktiviert ist (P_H 7.0–8.0). Eine starke Casein-Hydrolyse kann auch bei schwach saurer Reaktion (P_H 6.0–6.5) beobachtet werden. Caseino-Pepton wurde schwach durch den unaktivierten, deutlich durch den aktivierten Saft angegriffen. Albumine (E. Merck) zeigten eine starke Resistenz gegenüber der Trypsinwirkung.

2. Der Pankreassaft hydrolysierte weder Dipeptide noch

Tripeptide. Für die Erepsinwirkung des Mazerationssaftes der Pankreasdrüse muss infolgedessen die Gewebspeptidase das Drüsengewebes verantwortlich sein.

3. Der Saft ist, unabhängig von der Aktiverung, nur imstande, einige, gewisse Halogenacylaminosäuren anzugreifen, Halogenacyldipeptide dagegen nicht. Acylderivate wurden durch ihn nicht hydrolysiert.

LITERATUR.

Abderhalden, E. (1925–26): Z. f. physiol. Chem., **151**, 151.
Abderhalden, E. und Herrmann, O. (1929): Fermentf., **10**, 474.
Abderhalden, E. und Schwab, E. (1929): ebenda, **10**, 478.
Abderhalden, E. und Zeisset, W. (1929): ebenda, **10**, 481.
Breton, Le und Mocoroa, F. (1933): Chem. Zentralbl., II. **1**, 559.
Fischer, E. und Abderhalden, E. (1905): Z. f. physiol. Chem., **46**, 52.
Imai, T. (1924): ebenda, **136**, 173.
Itzioka, F. (1936): J. of Biochem., **24**, 193.
Northrop, J. H. (1933): Ergebnisse der Enzymforschung, **2**, 104.
Willstätter, R. (1928): Untersuchungen über Enzyme, Abschnitt, **9**.
Waldschmidt-Leitz, E. und Waldschmidt-Graser, J. (1927): Z. f. physiol. Chem., **166**, 247.
Waldschmidt-Leitz, E. (1924): ebenda, **132**, 188.
Waldschmidt-Leitz, W., Klein, W. und Schäffner, A. (1928): Ber. chem. Ges., **61**, 2092.
Walschmidt-Leitz, E. und Purr, A. (1929): ebenda, **62**, 2217.
Walschmidt-Leitz, E. und Shinoda, O. (1928): Z. f. physiol. Chem., **176**, 301.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

SPECTROSCOPIC STUDIES ON PURIFIED ENZYMES. III. Report.

On Lipase, Urease and Tyrosinase.

By

RYOJI ITOH.

(*From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.*)

(Received for publication, August 17, 1936)

In the previous communication (Itoh, 1935, 1936) the author described the spectroscopic studies on purified xanthine oxidase, katalase, amylase and peroxidase. Further we studied on lipase, urease and tyrosinase, the results of which are reported in this paper.

I. Ricinus lipase.

1. Preparation.

The enzyme preparation applied for this study was the same as described in the previous communication (Itoh, 1936).

2. Spectroscopic result.

The enzyme preparation obtained was very active showing lipase value (pH. L. W.) 47 in an estimating vessel of 3.5 cm × 14.0 cm. The preparation possessed phosphor and nitrogen, its phosphor and nitrogen content showed 1.26% and 7.9% respectively, and was positive in usual protein colour reactions.

Since this highly purified enzyme preparation is very unstable and easily inactivated by air the test for spectrophotometry was carried out after being dissolved in olive oil under protection from inactivation by air. The spectroscopic examination showed that the enzyme possesses only a sharp selective absorption band in the ultraviolet with its maximum at 278 mμ as shown in Fig. 1. The substance which showed a selective absorption band at 278 mμ would be protein as discussed in tyrosinase, and the enzyme would be protein in nature.

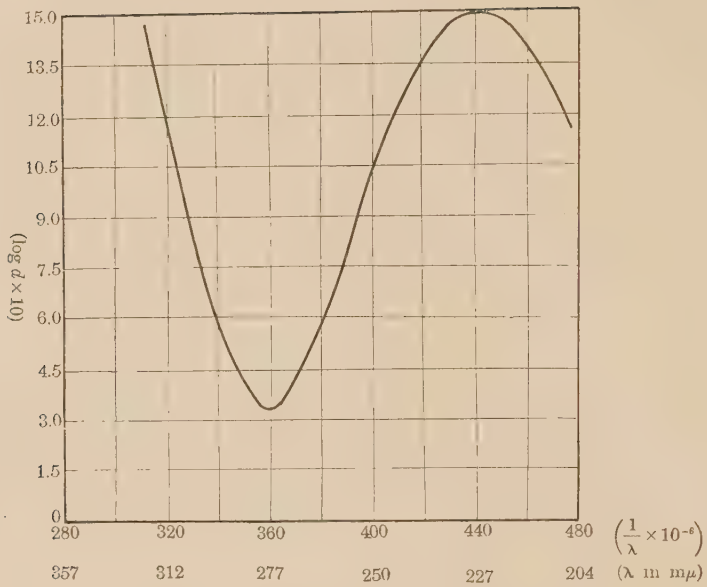


Fig. 1. Absorption curve of ricinuslipase.

II. Urease.

1. Preparation.

The preparation of urease was carried out by the method of J. B. Sumner (1926). 158 cc. of redistilled acetone was diluted with distilled water to 500 cc., and cooled to 22°C. To this cooled acetone 100 g of jack bean meal was added and stirred for 3–4 minutes thoroughly. Filtered through the Schleicher and Schüll filter, number 595. The filtrate was placed in an ice chest at 2–2.5°C and allowed to remain overnight. Then the precipitate which appeared next morning was collected by centrifuge, using cold centrifuge tube. The precipitates were not crystals as reported by Sumner but amorphous matters which were very active in the urease action. The precipitates were dissolved in distilled water at room temperature by stirring, and the insoluble matter was centrifuged off. The clear solution that was used for the spectroscopic studies was positive in usual protein colour reactions.

2. Result.

The spectroscopic examination showed a selective absorption band with its maximum at 265 mμ at pH 7 as shown in Fig. 2.

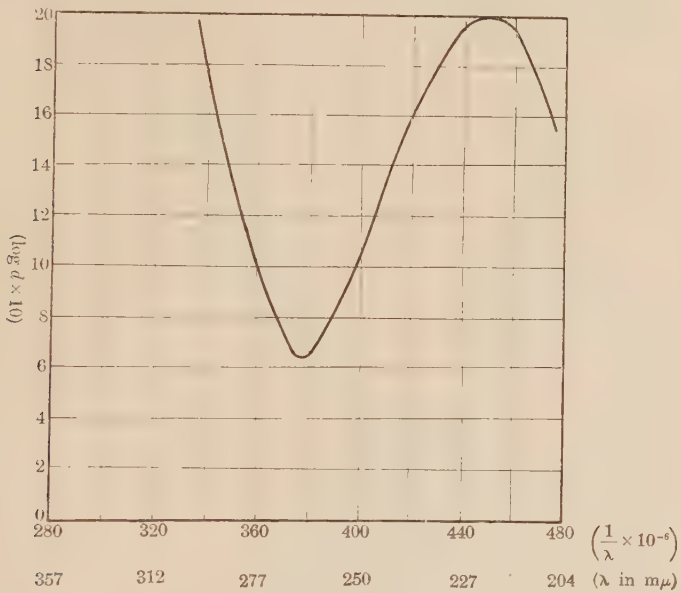


Fig. 2. Absorption curve of urease.

III. Tyrosinase.

1. Preparation.

The tyrosinase was prepared from potato peelings by the method of R. Chodat (1910). Namely the brown coloured aqueous extract of the peelings was mixed with alcohol until the concentration of the latter reached 40 per cent. The resultant precipitate was collected by centrifuge and washed with 95% alcohol. Then the precipitate was dissolved in one fifth volume of water of the original solution and placed overnight in an ice box. The undissolved portion was filtered off and the clear filtrate was again added to with alcohol. This procedure was repeated twice more and the final precipitate was dried in vacuum over H_2SO_4.

2. Results and Discussion.

The preparation thus obtained was very active and was freed from peroxidase and the usual protein colour reactions were positive. The spectroscopic examination of the tyrosinase solution showed a broad absorption band with its maximum at 276 mμ in the ultraviolet at pH 7 as shown in Fig. 3. The absorption band

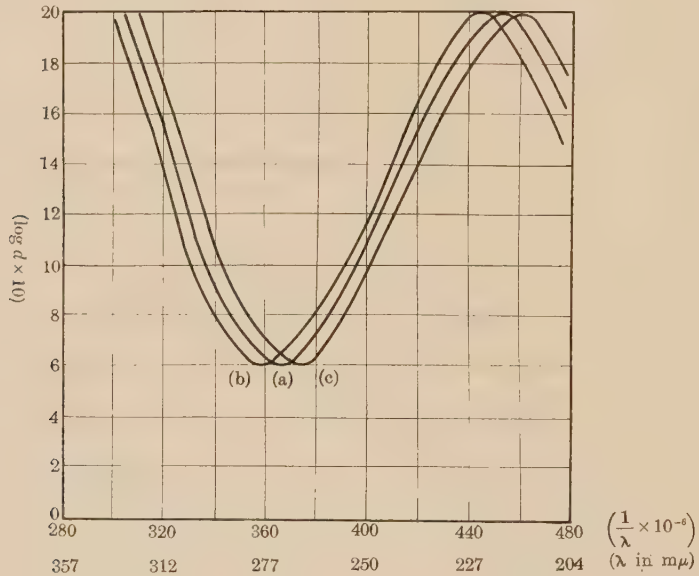


Fig. 3. Absorption curve of tyrosinase.
(a) pH 7. (b) pH 11. (c) pH 3.

shifted 5 mμ toward the longer wave lengths at pH 11, but at pH 3 the curve shifted toward the shorter wave lengths without alternation of absorption curve.

Obviously it is important to identify the nature of the substance giving spectral absorption at 276 mμ in the enzyme solution. For this object the author investigated casein, eggalbumin and a number of amino acids. The spectroscopic examination on casein showed a selective absorption band with its maximum at 277 mμ at pH 9.2, and at pH 2 the curve shifted to the shorter wave lengths with its maximum at 270 mμ and at pH 11 the curve shifted to the

longer wave lengths with its maximum at 291 mμ without alternation of absorption curve as shown in Fig. 4.

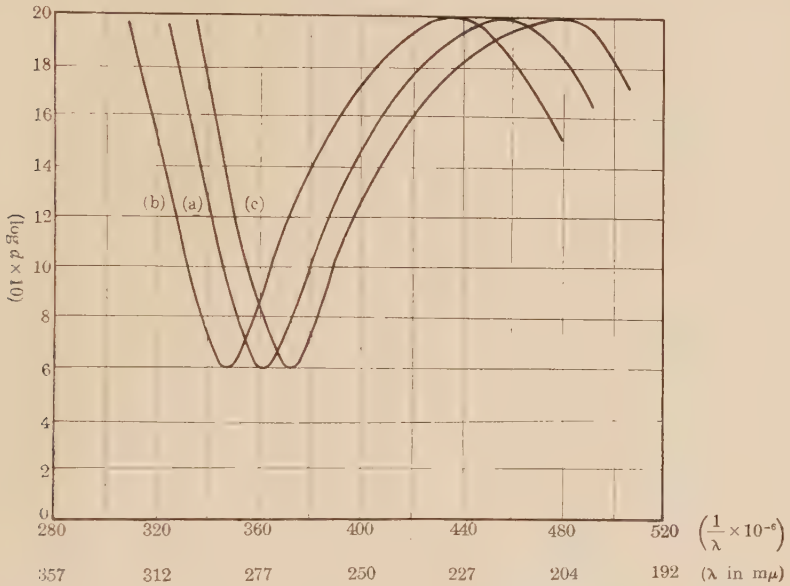


Fig. 4. Absorption curve of casein.
(a) pH 9.2. (b) pH 13. (c) pH 2.

The eggalebumin showed a band with its maximum at 280 mμ as shown in Fig. 5.

The ultraviolet absorption of the amino acids showed that the aliphatic amino acids do not show appreciable absorption above 250 mμ, but the aromatic amino acids tyrosin, tryptophane and phenylalanine have given absorption in the same spectral region as the proteins. The absorption maximum of tyrosin, tryptophane and phenylalanine were 275 mμ, 280 mμ and 262 mμ respectively, curves were shown in Fig. 6. In this case tryptophane and phenylalanine examined at pH 7, but the tyrosin investigated in 0.01 N HCl solution on account of its low solubility at pH 7.

Though there is an overlapping phenomenon as in the case of the blood plasma, where the selective absorption of the proteins entirely masks that of the uric acid, the view may be held that the

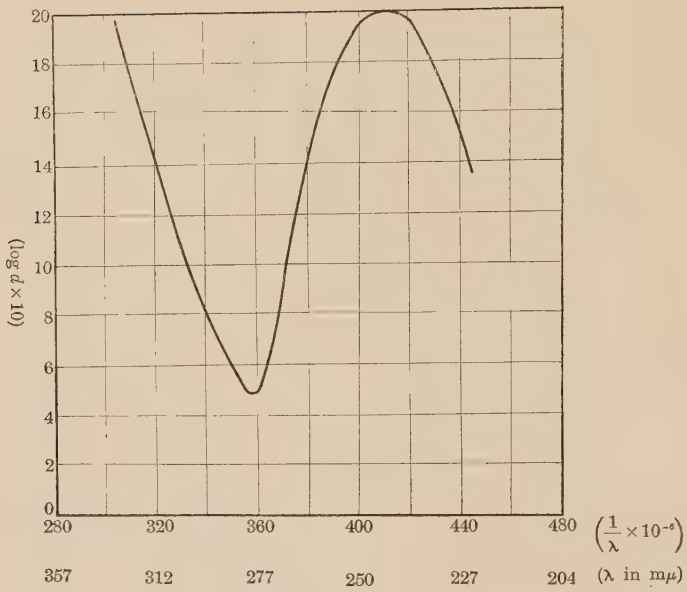


Fig. 5. Absorption curve of eggalbumin.

substance giving spectral absorption at 273 mμ in the tyrosinase solution may be proteinlike in nature. And the ultraviolet absorption of the proteins in the region above 250 mμ should be due to the aromatic amino acids. The shift of the absorption band towards the longer wave lengths in decrease of hydrogen ion concentration and the shift towards the shorter wave lengths in increase of hydrogen ion concentration may be caused perhaps by the enolisation of protein molecule or by the change in the molecular state such as dissociation and aggregation.

Summary.

1. The ultraviolet absorption spectra of purified ricinuslipase, urease, tyrosinase, casein, eggalbumin and a number of amino acids have been measured.

2. The absorption spectrum of ricinuslipase showed a band with a maximum at 278 mμ.

3. Urease showed a band with its maximum at 265 mμ at pH 7.

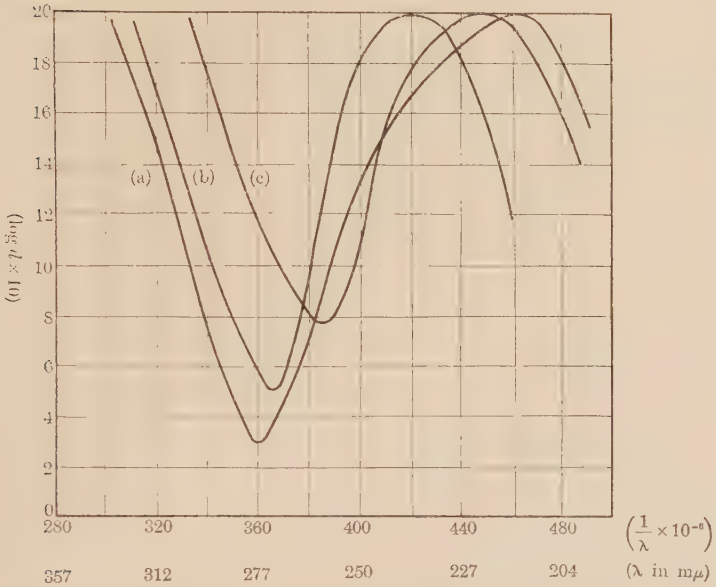


Fig. 6. Absorption curve of tyrosin tryptophane, phenylalanine. (a) tryptophane. (b) tyrosin. (c) phenylalanine.

4. Tyrosinase showed a band with a maximum at 276 mμ, the band shifted towards the longer wavelengths in an alkaline solution and towards the shorter wavelengths in an acid solution without alternation of absorption curve.

5. Casein showed a band with a maximum at 277 mμ (pH 9.2), the band shifted towards the longer wavelengths in an alkaline and the shorter wavelengths in an acid solution without alternation of absorption curve.

6. A band with a maximum at 280 mμ was found in eggalbumin.

7. Aliphatic amino acids showed no appreciable absorption band.

8. Aromatic amino acids, tyrosin tryptophane and phenylalanine have given absorption with a maximum at 275 mμ, 280 mμ and 262 mμ respectively.

The author is greatly indebted to Prof. Dr. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES.

Chodat, R. (1910): Handbuch d. Biochem. Arbeits methode III. 57.
Itoh, R. (1935): J. of Biochem., **22**, 139.
Itoh, R. (1936): J. of Biochem., **23**, 125.
Itoh, R. (1936): J. of Biochem., **23**, 299.
Summer, J. B. (1926): J. of Biolog. Chem., **69**, 435.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XXI. Assimilability and Disintegration Chemism of N-Monoacetylglucosamine.

By

KUNIICHI WATANABE.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, August 21, 1936)

In 1907, Meyer asserted that glucosamine becomes much more assimilable to the animal body, when it is acetylated at the nitrogen atom. It was based on the fact that any reducing substance was detected neither in feces nor in urine of 48 hours after a rabbit had been administered with the acetyl derivative per os. In similar experiments of the present writer, acetylglucosamine was hardly excreted by the kidney in fact, not far from the Meyer's finding, while at the same time urine nitrogen showed no increase and, on the contrary, 67% of the amount given were recovered from the intestinal content and feces together.

According to the recent researches of Kawabe (1934, i), one of our collaborators, glucosamine ingested was absorbed to the extent of 81 to 96% in 24 hours from the alimentary canal and metabolized from 69 to 81%. Compared with his results, the writer's seem to prove glucosamine to be much less absorbable, when acetylated, than in a free state. An argument to affirm this inference was further given by ingesting the acetylation product in two or three fractions or in a larger doses because absolute amount of the substance excreted in urine was not influenced thereby. Probably the permeability of intestinal mucosa to this compound is extremely limited.

For the purpose of examining the degree of its assimilation, subcutaneous injection was applied so that a large quantity reaches the metabolic organs at a time. From the result, however, it was

found that most of the injected mass is regained from a day's urine without suffering any conversion besides a trace of free glucosamine, whereas, from what Kawabe observed, glucosamine is excreted as such in much less amount. Therefore, acetylglucosamine seems to be markedly less assimilable than the unacetylated.

In addition, experiments in vitro were performed, which revealed the following facts:

1. Merely liver pulp excluding all other tissues examined disintegrated acetylglucosamine in vitro.

2. The experiments on liver pulp showed the formation of free glucosamine, as did those on the animal body, although restricted to a trace.

3. Optical pH for disintegrating acetylglucosamine is 6.7.

4. The enzyme concerned is more labile than glucosaminase.

Judging from these observations it may be regarded as justified that the disintegration takes place with primary deacetylation in liver followed by consecutive conversions by the enzyme "glucosaminase" (Kawakami) and others not only in loco but also in such organs as kidney, lung and so on, to where glucosamine freed from acetyl radicle is transported.

Experiment.

I. On absorbability and assimilability.

Grown up male rabbits were employed and the experiment was made after the animal had been accustomed to bean curd refuse for 7 days or longer, which was given 150 gm per kg body weight each day at between 9 to 10 a.m. The stock food was kept cool in a stoppered flask, after being mixed throughout, for the use of one whole experiment.

On the day of the main experiment, the rabbit was administered at 8 a.m. with 2 gm. of acetylglucosamine per kg bodyweight, wrapped in wafers with a small portion of the diet, and the urine of the following 24 hours was collected both by receiving the portion voided by itself in a flask, containing toluene alone or 5 cc. of 30% acetic acid besides, and by emptying the

remaining out of the bladder by means of a catheter.

Estimations were made on pH, total nitrogen, total and acetylglucosamine and reduction power after the thus collected urine had been made up to a proper volume with washings of the bladder and water.

Analytical and calculation methods:

pH,	by the Clark and Lubs indicater method.
Reduction power,	by the Benedict method and was calculated as glucosamine according to Kawabe (1934, ii).
N-monoacetylglucosamine,	by the procedures described in a foregoing communication (Watanabe 1936, i).
Total glucosamin-N which signifies the total sum of N belonging to glucosamine and of N-monoacetylglucosamine	estimated by treatment of the evaporated protein-free residue with acetic anhydride, as described by Watanabe (1936, ii) for determination of glucosamine, and computed by multiplying the amount of total glucosamine in terms of its chlorhydrate with the factor 14/216.
Free glucosamine,	expressed by (total glucosamin-N-acetylglucosamine-N) $\times$ 179/14.

Table I. gives typical examples in general.

From figures of Exp. 2, it is seen that total nitrogen in urine was scarcely increased on ingestion of acetylglucosamine, in other words, the mucosa of alimentary canal is little permeable to it. In Exp. 1, it was even decreased which is but undoubtedly within the analytical error. In both experiments a small portion of the absorbed acetylglucosamine was excreted chiefly as such and partially in a free state (free glucosamine-N: 0.54 and 0.83 mg or 14 and 20% of the total glucosamine-N respectively).

In Exp. 3 and 4, the excretion of acetylglucosamine was not altered by giving larger doses, which suggests that the absorption

TABLE I.

Date	Urine volume cc	pH	Total N		total glucosamine-N		Acetylglucosamine			Free glucosamine		Urine volume to reduce 10 cc of Benedict sol. cc	Reduction power calc. as glucosamine (free) mg
			%	mg	mg	„ -N mg	mg	% of administered amount	„ -N mg	mg	„ -N mg		
Exp. 1 Rabbit No. 1.[4] ♂ Bodyweight (2190 gm.) remained constant for the whole period of experiment.													
July 15–16	190	8.0[1]	0.9975	1895.3								35.2	(94.08)
„ 16–17	210	8.0	0.8960	1881.0								38.8	(94.32)
average	200		0.9468	1888.2								37.0	(94.20)
July 17[2]–18	140	8.0	1.3450	1882.9	3.9	1.40	53.2	1.21	3.36	6.9	0.54	16.92	144.21
Increase				−5.3									50.01[3]

1) Toluene was poured into the flask for collection of urine.
2) 4.4 gm. of acetylglucosamine (2 gm. kg bodyweight) were ingested at 8.0 a.m. No diarrhea was observed after ingestion of acetylglucosamine.
3) 50.01 mg of free glucosamine contain 39.1 mg of N.
4) 2.813 mg of acetylglucosamine were recovered from the intestinal content and feces together after 24 hours.

Exp. 2 Rabbit No. 2. ♂ Bodyweight (2090 gm.) remained constant throughout the experiment													
July 23–24	195	—[1]	0.8172	1593.6								36.0	(94.41)
„ 24–25	200	—	0.7790	1557.9								37.0	(94·21)
average	197.5		0.7981	1575.8								36.5	(94.31)
July 25–26	215		0.7568	1627.2	4.09	1.5	51.6	1.2	3.26	10.54	0.83	25.5	146.95
Increase				41.4									52.64[3]

1) 5 cc. of 30% acetic acid were poured into the flask for receiving urine.
2) 4.2 gm. of acetylglucosamine (2 gm. p. kg bodyweight) were ingested at 8.0 a.m.
3) Correspond to 4.1 mg of glucosamine-N.

Exp. 3 Rabbit No. 3. ♂ bodyweight: 2190 gm. 6.6 gm. acetylglucosamine (3 gm. p. kg bodyweight) were ingested in three portions at intervals of 5 hours, beginning at 8.0 a.m.

July	29–30	195				4.16	0.99	51.91	0.78	3.28	11.20	0.88		

Exp. 4 Rabbit No. 4. ♂ bodyweight: 2330 gm. 9.3 gm. (4 gm. p. kg bodyweight) were ingested at 8.0 a.m.

Aug	2– 3	235				3.31	0.59	38.0	0.4	2.39	12.33	0.92		

Exp. 5 Rabbit No. 5 ♂ bodyweight: 2055 gm. 4.1 gm. of acetylglucosamine (2 gm. p. kg bodyweight) were injected with 12.3 cc. of water subcutaneously at 8.0 a.m.

Sept.	19–20	236				197.58	76.1	2879.2	70.2	182.25	194.7	15.33 (5.9% of inj. N)		

Exp. 6 Rabbit No. 6. ♂ bodyweight: 2040 gm. 2 gm. of acetylglucosamine (1 gm. p. kg bodyweight) were injected subcut. with 6 cc. of water, in two portions at an interval of 5 hours, beginning at 8.0 a.m.

Sept.	23–24	245				112.89	89.1	1641.5	82	103.90	114.17	8.99 (7.1% of inj. N)		

Exp. 7 Rabbit No. 7. ♂ bodyweight: 2040 gm. 4 gm. of (2 gm. p. kg bodyweight) were inj. subcut. with 12 cc of water in two portions at an interval of 5 hours, beginning at 8.0 a.m.

Oct.	1– 2	230				183.60	72.51	2737.0	68.4	173.25	131.10	10.35 (4.1% of inj. N)		

Exp. 8 Rabbit No. 8. ♂ bodyweight: 2010 gm.

Oct.	1– 2	230				195.54	77.8	2875.0	71.8	181.98	172.04	13.56 (5.3% of inj. N)		

is limited in the extreme, because, as will be proved below, the substance is not readily assimilated and, accordingly, the more of the substance that is administered, the more of it would appear in urine, if the absorption threshold were low.

In Exp. 5–8, where the substance was given subcutaneously, 68–82% of the transferred amounts were eliminated without any change and 4.1 to 7.1% as free glucosamine.

Isolation of the liberated glucosamine from urine was tried by extracting off acetylglucosamine with amylalcohol, which does not dissolve the former. But the attempt failed, owing likely to its too small concentration and to the probable increase of its solutility by the simultaneous presence of the acetyl derivative.

Recovery of acetylglucosamine in the feces and intestinal content.

The experiment was made on rabbit No. 1.

The digestion mass was squeezed out from the whole intestine which had been cut out immediately after the collection of urine. The intestine was then opened and washed. The content was combined with washings and feces excreted in the preceding 24 hours, and digested at first on a water bath with 10 cc. of 30 cc. acetic acid, under stirring, afterwards boiled for a while on an asbestos sheeting, until the volume was reduced to 500 cc. It was filtered, then 20 cc. of the liquor was diluted to 150 cc. and precipitated with an equal part of 25% mercuric acetate solution. The solution thus obtained was almost colourless. After treatment with H_2S, analysis gave 0.75 mg of acetylglucosamine in 1 cc., namely in total, 2813 mg. Consequently 67% of the ingested were recovered.

Without boiling with alkali, the filtrate, removed from Hg, scarcely developed red colour on addition of the Ehrlich's reagent.

II. Experiments on the enzymic disintegration.

A fresh bull tissue was minced by means of a masticator, ground in a mortar, and 2 gm of the pulp prepared were incubated in a stoppered tube with 1 cc. of acetylglucosamine solution containing 36.96 mg and 0.85% saline solution which was added up to

12 cc. Incubation temperature was 38°C and two drops of toluene were used for keeping the mixture aseptic. Free and total glucosamine were analysed on the mixture diluted to one tenth. As a control experiment, another portion of the tissue pulp was taken and digested identically with glucosamine in place of the acetylated.

Tissues such as pancreas, lung, kidney, heart, cerebrum, cortex of suprarenal capsule, thyroid, ovary, muscle, spleen and intestinal mucosa of the bull were examined. Although glucosamine decomposition was caused by any of them as observed already (Watanabe 1936, II), all except the liver were found inert on the acetyl derivative. An example of the liver is shown in table II.

TABLE II.

			time of incubation (hours)	
			0	5
Control run	Glucosamine remaining unconverted in terms of the chlorhydrate	(mg)	36.0	31.92
Main run	acetylglucosamine.	(mg)	36.96	34.80
	„ -N.	(mg)	2.3376	2.2008
	total glucosamine-N.	(mg)	2.3352	2.1960
	free glucosamine-N.	(mg)	−0.0024	−0.0048

Contrary to what will be seen in later experiments, no free glucosamine was detected in this main digestion mixture after incubation. It must have been wholly disintegrated by glucosaminase coexistent in the tissue as soon as it was set free from the substrate added.

Further study on this new enzyme was made likewise by extending the time of incubation and varying pH of the mixture, as illustrated in tables below.

Stabilility of the enzyme.

Deacetylation stopped in 5 hours while glucosaminase was still active, under the present experimental conditions. (Table III)

Table III.

			Time of incubation (hours)			
			0	5	10	24
Example 1.	control exp.	glucosamine chlorhydrate (mg)	36.0	32.2	30.2	29.5
	main exp.	acetyl-glucosamine (mg)	37.0	34.1	34.1	34.1
		„ -N. (mg)	2.344	2.157	2.157	2.157
		total glucosamine-N. (mg)	2.351	2.193	2.193	2.193
Example 2.	control exp.	glucosamine chlorhydrate (mg)	35.8	32.4	30.7	30.2
	main exp.	acetyl glucosamine (mg)	36.8	35.0	35.0	35.0
		„ -N. (mg)	2.331	2.218	2.218	2.218
		total glucosamine-N. (mg)	2.336	2.221	2.221	2.221

Table IV.
Incubation: 5 hours.

pH		2.3	4.7	5.6	6.3	6.7	7.7	8.6	9.7	10.5	12.4
Control exp.	Glucosamine chlorhyrate mg	0	0	0	1.68	2.88	2.88	1.92	0	0	0
Main exp.	Acetyl-glucosamine mg	0	0	0	2.16	2.4	2.16	2.16	0	0	0

Limits of pH for the action of the enzyme.

4 cc. of 0.85% NaCl in the digestion mixture of the prior experiment were replaced by the equal volume of one of the Sörensen's buffer solutions (citrate (pH 2.3–6.7), phosphate (7.7) and glycocoll (8.6–12.4) mixtures) and, in control experiments, the equal volume of the glucosamine chlorhydrate solution which had been neutralized and contained 3.6 mg. was employed as a substitute of the acetyl-glucosamine solution. Digestion was continued for 5 hours. As demonstrated in table IV, the enzyme displays

its activity between pH 6.3 and 8.6.

Thanks are due to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant towards the expenses of this research.

REFERENCES.

Kawabe, K. (1934, i): Journ. of Biochem., **20**, 293.
„ (1934, ii): Journ. of Biochem., **19**, 319.
Kawakami, I. (1934): Journ. of Biochem., **20**, 423.
Meyer, K. (1907): Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., **9**, 134.
Watanabe, K. (1936, i): Journ. of Biochem., **23**, 371.
„ (1936, ii): Journ. of Biochem., **23**, 365.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XXII. On Animal β-N-Monoacetylglucosaminidase. Preliminary Report.

By

KUNIICHI WATANABE.

(*From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.*)

(Received for publication, August 21, 1936)

As was noted, in the foregoing communication (Watanabe 1936, i), *N*-monoacetylglucosamine is with difficultly assimilable to the animal body, whereas, it is readily disintegrated, when deacetylated.

The significant role played in another connection by the acetyl radicle has been demonstrated by previous authors, so, for instance, chitosan, the partially deacetylated derivative of chitin, becomes, after reacetylation, again as attackable as the latter by snail chitinase (Karrer and Francois, 1929) and, according to the more recent investigations of Helferich and his co-workers (1934), emulsin which hydrolyses glucosides of β-*N*-acetylglucosamine is hardly capable of cleaving up phenol-β-glucosaminide. For the process of hydrolysis, therefore, acetylation of the nitrogen atom is deemed of primary importance. The fact that both animal and plant glucosamine complexes which have been heretofore investigated on this point are all acetylated, stands in favour of this suggestion.

The present report verifies the presence of the enzyme which splits up the *N*-acetylated β-glucosaminide in animal tissues.

Experimental.

In a speculative attempt which was proceeded by letting fresh bull liver hash act, suspended in water, on phenol-β-*N*-acetylglucosaminide, the amount of free phenols was found to get enor-

mously large, so that the study was extended on a systematic undertaking as seen in the following.

Phenol-β-*N*-acetylglucosanide was prepared after Helferich and Schmitz (1933), and phenol analysis made by the procedures of the writer (Watanabe 1936, ii)

1. *Is the increase of free phenol caused by hydrolysis of the acetylglucosaminide?*

The digestion mixtures were composed of:

Bull liver hash	1 gm
Phenol-β-N-acetylglucosaminide solution (0.9% saline solution) containing 6 mg in 1 cc.	1 cc.
0.9% saline solution	ad 6 cc.
Toluene	1 drop.

In one (I) of the control runs, the substrate solution was omitted and in the other (II), bull liver hash was employed which had been heated in 0.9% saline solution just to boiling. Incubation was continued at 38°C for 2 hours.

At the outset of digestion, content of free phenols was 0,2820 mg calculated as phenol in both the main and control experiments, and after 2 hours, in the former 1.3200 mg and in control run I 0.3588 mg and in II 0.2820 mg. Therefore phenol which is regarded to have originated from β-acetylglucosaminide was 0.9612 mg, corresponding to 1.830 mg of glucosamine.

As the sum of liberated glucosamine and acetylglucosamine which was estimated by treating the evaporated residue of the deproteinized mixture with acetic anhydride (Watanabe 1936, iii) amounted to 1.823 mg, computed as glucosamine, the excess of phenol in the main over that in control I, appears to have been wholly yielded from the substrate added.

2. *Influence of pH on the enzyme activity.*

0.5 gm. of liver hash, 2 cc. of buffer solution and 1 cc. of the substrate solution equally concentrated as above were adjoined together and the mixture was placed for 1 hour, with 1 drop of toluene, in a thermostat at 38°C, after being made up to 6 cc. with water. In table I the results of the control experiments carried

TABLE I.

Example 1.

Incubation hour \ pH			2.3	4.7	5.6	6.3	6.7	7.7	8.6	9.6	11.08	12.4
0	Free phenols calc. as phenol mg	main exp.	0.1812	"	"	"	"	"	"	"	"	"
		control	0.1812	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1	Free phenols calc. as phenol mg	main (a)	1.5264	1.3296	1.1424	0.7728	0.5232	0.4944	0.3672	0.2736	0.2736	0.2508
		control (b)	0.4416	0.3768	0.3096	0.3084	0.3048	0.2760	0.2736	0.2736	0.2736	0.2508
	Increase of free phenols calc. as phenol mg	a—b	1.0848	0.9528	0.8328	0.4644	0.2189	0.2184	0.0936	0.0	0.0	0.0
		control	0.2604	0.1956	0.1284	0.1272	0.1236	0.0948	0.0924	0.0924	0.0924	0.0696
	Decrease of phenol β-acetylglucosaminide in main exp. %		57.1	50.1	43.8	24.4	11.5	11.4	4.9	0.0	0.0	0.0

TABLE I.—(Continued) Example 2.

Incubation hour \ pH			1.03	1.1	1.3	1.9	2.3	3·7	4.7	5.6
0	Free phenols calc. as phenol mg	main exp.	0.1237	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,
		control	0.1237	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,
1	Free phenols calc. as phenol mg	main (a)	0.4080	0.6336	1.2864	1.5552	1.6032	1.6128	1.4304	1.2576
		control (b)	0.3000	0.3888	0.4020	0.4464	0.4524	0.3504	0.1905	0.1770
	Increase of free phenols calc. as phenol mg	a—b	0.1080	0.2448	0.8844	1.1088	1.1508	1.2624	1.2399	1.0806
		control	0.1763	0.2651	0.2783	0.3227	0.3287	0.2267	0.0668	0.0533
	Decrease of phenol β-acetylglucosaminide in main exp. %		5.6	12.8	46.5	58.3	60.5	66.4	65.2	56.8

TABLE I.—(Continued) Example 3.

Incubation. hour \ pH			1.1	2.3	3.7	4.7	5.6
0	Free phenols calc. as phenol mg	main exp	0.1657	"	"	"	"
		control	0.1657	"	"	"	"
1	Free phenols calc. as phenol mg	main (a)	0.9744	1.6512	17088	1.5696	1.2576
		control (b)	0.3300	0.3864	0.3300	0.2856	0.2688
	Increase of free phenols calc. as phenol mg	a—b	0.6444	1.2648	1.3788	1.2840	0.9888
		control	0.1643	0.2207	0.1643	0.1199	0·1031
	Decrease of phenol β-acetylglucosaminide in main exp. %		34.0	66.6	72.2	67.6	52.0

out without the substrate are tabulated to-gether. Buffer solutions employed were citrate (pH 2.3 6.7), phosphate (7.7) and glycocoll (1.03–1.9 and 8.6–12.4) mixtures of Sörensen.

Examples 2 and 3 indicate that the optimal pH of β-*N*-monoacetylglucosaminidase lies at 3.7 or on the acid side adjacent to it and that of the enzyme complex which hydrolyses the conjugated phenols preexisting in tissue at 2.3.

3. The distribution of β-N-monoacetylglucosaminidase among bull tissues.

In like manners, the hydrolysis of the β-acetylglucosaminide by various kinds of bull tissues were examined at pH 3.7. The results are listed in table II. The numbers show that muscle and blood contain only traces of the enzyme although the former contains a large quantity of free phenols preformed. All else except

cerebrum, cortex of adrenal and pancreas are rich in this enzyme.

Table II.

Time of incubation: 1 hour.

Kind of tissue	No.	Phenol liberated from phenol β-N-acetylglucosaminide mg	Decrease of substrate %
Liver	1	1.2624	66.6
	2	1.3788	72.6
Heart	1	1.4370	75.6
	2	1.2798	67.3
Mucosa of the fourth stomach	1	1.2108	63.7
	2	1.2756	67.1
Kidney	1	1.1298	59.4
	2	1.2000	63.3
Thyreoidea	1	0.9942	52.2
	2	1.2870	67.7
Mucosa of small intestine	1	1.0572	55.6
	2	0.9624	50.6
Spleen	1	1.1232	59.1
	2	0.9600	50.5
Lung	1	1.0356	54.5
	2	0.9252	48.7
Gl. submaxillaris	1	1.1424	60.1
	2	1.0320	54.3
Ovary	1	1.1532	60.7
	2	0.8760	46.1
Gl. parotis	1	0.7932	41.7
	2	0.8676	45.6
Cerebrum	1	0.5076	26.7
	2	0.5232	57.5
Cortex of adrenal	1	0.4056	21.5
	2	0.5568	29.3
Pancreas	1	0.2328	12.2
	2	0.2232	11.7
Skelet muscle	1	0.1068	5.6
	2	0.0960	5.0
Blood	1	0.0672	3.5
	2	0.0282	1.4

The writer desires to acknowledge his obligations to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant toward the costs of this work.

REFERENCES.

Helferich, B., Iloff, A. u. Streeck, H. (1934): Hoppe-Seyler's Zeits. f. physiol. Chem., **226**, 258.

Helferich, B. u. Schmitz-Hillebrecht, E. (1933): Ber. deutsch. chem. Ges., **66**, 378.

Karrer, P. u. v. Francois, G. (1929): Helv. chim. Acta. **12**, 986.

Watanabe, K. (1936, i): Journ. of Biochem., **24**, 287.

„ (1936, ii): Journ. of Biochem., **24**, 215.

„ (1936, iii): Journ. of Biochem., **23**, 371.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XXIII. On Animal β-N-Monoacetylglucosaminidase. II. Report: Purification of the Enzyme.

By

KUNIICHI WATANABE.

(*From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.*)

(Received for publication, August 21, 1936)

1. *Method of Preparation.*

A part of bull liver hash is shaken vigorously on a machine with 2 parts of acetic acid solution (100 cc. water plus 1 cc. of 30% acetic acid, pH: 3.6–3.8*) for 3 hours. At the end of this time, the mixture is centrifuged, the supernatant liquor is added to, while being shaken, with the double volume of 95% alcohol, and the deposit is separated as quickly as possible from the mother liquid by both centrifugalization and cumulative pressure between sheetings. After retreatment of it with acetic acid similarly to above, the extract which is faintly turbid is placed in an ice chest for the period of a week. Out of the clear solution obtained by filtration, 10 cc. are then mixed with 2 gm. of purified kaolin. pH brought to 7.0 with 1 m. sodium acetate solution and the volume was made up to 12 cc, followed by stirring up for half an hour. The supernatant liquid is decanted off and, instead, aqueous buffer solution (citrate) of pH 3.6 is added till the end volume reaches the foregoing, and hydrogen ion concentration which is shifted thereby is adjusted back with a few drops of 2 *n*. HCl. The solution of the enzyme which is eluted by agitating the mixture for the same duration as before is finally submitted to dialysis for 24 hours against running aqua destillata cooled with ice. The trans-

*) When mixed with the tissue pulp, pH is raised to 5.

parent yellowish liquor thus attained, behaves to protein colour tests as below:

Biuret reaction	+
Millons reaction	+
Hopkins-Cole reaction	trace
Lead sulfide reaction	±
Molisch reaction	+

2. *Yield.*

The yield was measured by calculating out the number of enzyme units per gm. of dry weight. One unit is assumed here as the amount of enzyme which is capable of hydrolysing half of phenol β-N-monoacetylglucosaminide involved in 50 cc. of 0.01389 mol solution, in a minute and at 30°C and optimal pH. This concentration of the substrate is one tenth of the molarity chosen by Weidenhagen (1929).

The number of the unit in 1 gm. was calculated by the formula:

$$\text{Enzyme number} = \frac{1}{\text{“Zeitwert”} \times g}$$

where g is the dry weight of the enzyme material used for 50 cc. of the digestion mixture, and "Zeitwert" $1n2$ divided by k, which denotes the constant of initial hydrolysis velocity, expressed by $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$.

In an example the yield was 14.21%, computed in the way as follows:

To estimate the activity of the liver hash, which was used as the starting material for preparation, the mixture composed of

Liver pulp	0.25 gm.
Citrate buffer solution (pH 3.8)	4 cc.
Phenol β-N-acetylglucosaminide solution (1.0318%)	4 cc.
and water	ad 10 cc.

was digested with two drops of toluene, and liberated phenol was estimated on the diluted and deproteinized solution as already described (Watanabe 1936). k was 0.00318 in averages. (Table I).

TABLE I.

Digestion temperature: 30°C.

Duration of incubation min.	Phenol liberated mg.	Hydrolysis degree %	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
10	0.4220	3.23	0.00329
20	0.7770	5.89	0.00304
30	1.1980	9.17	0.00321
			0.00318 (mean)

From 5 gm. of the liver pulp, there remained 1.4162 gm. of substance, when evaporated at first on bath and dried finally constant in vacuo over P_2O_5. Hence

$$\text{Enzyme number} = \frac{1}{\frac{\ln 2}{k} \times 1.416 \times \frac{1.25}{5}} = 0.02993$$

As to the purified enzyme solution, the numerical value of k was 0.00180. The enzyme was allowed to catalyse the hydrolysis by taking 1 cc. of the dialysed solution in place of 0.25 gm. of the liver hash in the above composition.

TABLE II.

Digestion temperature: 30°C.

Duration of incubation min.	Phenol liberated mg	Decrease of the N-monoacetyl-glucosaminide %	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
10	0.2160	1.65	0.00166
20	0.4660	3.56	0.00181
30	0.7400	5.66	0.00194
			0.00180 (mean)

Since 100 cc. of the enzyme solution contained 1.69071 gm. of dry substance, enzyme number was 0.70737 $\left(= \frac{1}{\frac{\ln 2}{k} \times 1.69071 \times \frac{5}{100}}\right)$

Therefore, the enzyme was purified 24 times $\left(=\frac{0.70737}{0.02993}\right)$ and, as 1500 gm. liver tissue gave 151 cc. of the final solution, the yield was

$$\frac{1.691 \times 1.51 \times 0.7074}{1.416 \times \frac{1500}{5} \times 0.02993} = 14.21\%$$

3. Stability of the enzyme in solution at pH 3.6.

A solution of the enzyme eluted from kaolin was stored without dialysis in an ice chest (3–5°C) and the enzymic activity was determined at intervals by digesting, with 4 cc. of it, 20.636 mg of the acetylglucosaminide dissolved in 2 cc. of water. The enzyme solution was adjusted to pH 3.8 by means of a minute quantity of 2 n HCl, in advance of use and hydrolysis was measured by the amount of liberated phenol as before. As is seen in table III, no decrease of the enzyme activity was observed so long as it was examined (1½ months).

Table III.

Time of incubation: 1 hour.

Temperature: 38°C.

Days of storage	Phenol set free mg	Decrease of the N-mono-acetylglucosaminide %
0	3,6732	56.25
5	3,6828	56.40
9	3,6828	56.40
13	3,7020	56.69
17	3,7032	56.71
21	3,6828	56.40
25	3,6732	56.25
29	3,6540	55.96
32	3,6540	55.96
36	3,6732	56.25
40	3,6732	56.25
46	3,6540	55.96

4. *Extractibility of the enzyme.*

From the tissue pulp and also from the alcoholic precipitate, more enzyme is extracted by acetic acid (pH 5) than by water, glycerol or NaOH (pH 8.5). In table IV are listed examples, where two parts of liquids were employed to each part of the enzyme materials and, in cases of acetic acid and NaOH, a few drops of the more concentrated acid (30%) or alkali (30%) were added in addition, because pH of the extraction liquors were moved by the enzyme material. The mixtures were shaken violently for 3 hours with toluene (0.5 cc. to 10 cc. of the former) and the enzymic power of the extracts was determined in the way like above. The digestion mixture was made by mixing the following components.

Liver pulp	0.5 gm.
or neutralized extract*	1.5 cc. in case of extract from tissue
	3 cc. in case of extract from alcoholic precipitate
citrate buffer solution (pH 3.7)	2 cc.
phenol β-N-acetylglucosaminide solution containing 6 mg. in 1.cc.	1 cc.
water	ad 6 cc.
toluene	1 drop.

Control experiments were carried out, as in the preceding, by replacing the substrate solution with water. (Table IV).

TABLE IV.

Incubation time: 2 hours. Temperature: 38°C.

a. Example of extraction from tissue pulp.

Kind of tissue or of extracting liquor	Phenol liberated mg	Decrease of phenol β-N-acetylglucosaminide %
Bull liver	1.1628	61.22
Acetic acid	0.9576	50.41
Water	0.8784	46.24
Glycerol	0.6792	35.75
Alkali	0.6816	35.88

* the extract was neutralized with a little 30% NaOH or 30% acetic acid.

b. Example of extraction from alcoholic precipitate.		
acetic acid	0.3488	18.36
Water	0.2892	15.22
Alkali	0.2262	11.90

5. *Precipitability of the enzyme from acetic acid solution.*

The tissue extract in acetic acid was treated with a multiple of 95% alcohol, and the deposit was separated quickly from the mother liquor as described in Section 1. The bulk thus precipitated from 30 cc. of the extract were then divided into four equal fractions to determine the hydrolysis power, using two of them for the main experiment, and the remaining for the control. Incubation was performed under conditions similar to before, save that one fraction of the above precipitate was employed instead of 0.5 gm. of tissue pulp. The figures in Table V prove that the double volume of alcohol yields best.

Table V.

Parts of alcohol added	Phenol set free from substrate mg	Decrease of substrate %
2	1.1484	60.4
3	1.0608	55.8
4	1.0584	55.7
5	0.9396	49.3
6	0.8484	44.7
7	0.7956	41.9

Remarks.

1. On precipitation twice with alcohol, the enzyme was markedly inactivated. Further purification in this way is, therefore, not desirable.

2. The enzymic activity was reduced nearly to a half when the alcoholic deposit was dried up in vacuo over P_2O_5 for 36 hours.

3. Trials were made also with acetone. But the hydrolysis power of the precipitate was not exactly evaluated by phenol

analysis, because the precipitant remaining in it gave an intensive Theis and Benedict reaction.

6. Adsorption of the enzyme to kaolin and its elution.

10 cc. of the enzyme solution at the stage of the second extraction were made up to 12 cc. with water after its pH had been changed to 2.0, 3.6, 4.6, 5.5, 6.8, 8.0 or 9.0 by use of an acid or an alkali (0.1 and 2 n HCl, 1 n acetic acid, 0.5 n Na_2CO_3, 0.5 n sodium acetate or 2 n NaOH) and agitated with 2 gm. of purified kaolin for half an hour, followed by centrifugalization. 5 cc. of the supernatant liquor were then adjusted to pH 7 by means of acid or alkali enumerated, and let digest phenol β-N-acetylglucosaminide for 2 hours at 38°C, after being mixed with 4 cc. of the buffer solution (pH 3.7), 2 cc. of the substarte solution containing 6 mg in 1 cc. and water which was added up to 12 cc. Asepsis was maintained with a drop of toluene as usual. The hydrolysis power of the enzyme solution which had not been treated with kaolin was examined in parallel, as a control test, in the similar way.

Table VI.

pH at which adsorption to kaolin was examined	Phenol set free mg	Decrease of phenol β-N-monoacetylglucosaminide %
2.0	0.03744	0.98
3.6	1.74528	**45.94**
4.6	0.49728	13.0
5.5	0.27840	0.73
6.8	0.01824	0.48
8.0	0.01056	0.27
6.0	0.00864	0.22
Control exp.:	1.85184	48.78

As is seen in table VI, the enzyme appears to remain mostly in solution at pH 3.6 and to be adsorbed more and more towards more alkaline and acid sides of it.

The writer next tried to recover the enzyme from kaolin by means of the buffer solution of pH 3.6, taking the enzyme solutions

from one and the same stock as was just done. Kaolin was treated at pH 2.0, 7.0, 8.0 or 9.0 and the supernatant liquor after centrifugalization was replaced by a nearly equal volume of a buffer solution at pH 3.8, then pH made to 3.6 with acid or alkali and agitated for 30 minutes after water had been added to the mixture up to the prior volume. The degree of hydrolysis by the eluate was examined as above.

Table VII.

pH of the mixture where enzyme was adsorbed	Amount of liberated phenol mg	Decrease of phenol β-N-monoacetyl-glucosaminide %
2.0	0.0278	0.73
7.0	1.5811	**41.6**
8.0	0.1882	4.9
9.0	0.0	0.0

The results are seen in table VII.

When the enzyme solution was exposed to pH 10 for 1 hour, the enzyme was inactivated to a remarkable extent. Hence the cause for the less activities of the eluates which were obtained from the at pH 8.0 and 9.0 treated kaolin may be sought to the destruction of the enzyme.

As pH 7 was thus proved most appropriate for the aim in view, the experiment was supplemented by verifying whether 3.6 is the optimum for recovery or not, by changing pH of the eluting agent, starting with adsorption at pH 7. (Table VIII).

Table VIII.

pH where enzyme was eluted	Liberated phenol mg	Decrease of substrate %
3.0	0.0067	0.17
3.6	1.6358	**43.1**
4.0	0.7853	20.7
4.5	0.6192	16.3
5.0	0.0998	2.6

The enzyme solutoin used was taken from the same stock as in the prior experiment.

Summary.

A preparation method of β-N-monoacetylglucosaminidase, the several conditioning factors therein and the stability of the enzyme were described.

Thanks are due to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for grants which have defrayed a part of the cost of this investigation.

REFERENCES.

Watanabe, K. (1936): Journ. of Biochem. **24**, 215.

Weidenhagen, R. (1929): Zeits. d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie **79**, 591.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XXIV. On Animal β-N-Monoacetylglycosaminidase. III. Report: Kinetics of the enzyme action.

By

KUNIICHI WATANABE.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Hasamune.)

(Received for publication, August 21, 1936)

Using the purified enzyme (Watanabe, 1936, i), studies were devoted to see the effect of hydrogen ion concentration on the activity, the chemical kinetics and the specifity of its reaction, which will be described in detail in the following.

1. *Optimal pH for the enzyme activity.*

The enzyme solution dialysed was let hydrolyse phenol β-N-acetylglucosaminide at various pH under like conditions as in the study on tissue pulp (Watanabe, 1936, ii), namely, the solution composed of

Enzyme solution	3 cc.
Citrate buffer solution	2 cc.
Substrate solution containing 10.318 mg. in 1 cc.	1 cc.
and toluene	1 drop

Table I.

pH of incubation mixture	Increase of phenol mg.	Decrease of substrate %
2.4	1.6670	51.0
3.0	2.5512	78.0
3.6	2.7154	83.1
3.8	2.8133	86.1
4.1	2.8133	86.1
4.5	2.7672	84.7
4.6	2.5512	78.1

was digested at 38° for 1 hour and the liberated phenol* was estimated.

According to the figures obtained (Table I), the optimal pH lies between 3.8 and 4.1. No shift of it is caused therefore by purification. (refer to the preliminary report, Watanabe 1936, ii)

2. *Kinetics.*

The experiment was carried out by joining together the following solutions, which had each been just warmed to 35°C:

Enzyme solution	3 cc.
Citrate buffer solution (pH 3.8)	2 cc.
Phenol β-N-acetylglucosaminide solution containing 10.318 mg in 1 cc.	1 cc.

1 drop toluene was added as usual. The concentration of the substrate in the above mixture is

$$\frac{0.1389}{4} \times \frac{1}{6} = 0.00579\,\mathrm{m}.$$

Table II.
Temperature of incubation: 35°C.

Time of incubation min.	Phenol freed mg.	Decrease of phenol-β-N-acetyl-glucosaminide %	$k \cdot 10^4 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \cdot 10^4$	$(k_1 K_M + k_2 K_M') \times 10^4$
30	0.8126	25.0	95.9	112.0
60	1.3392	41.2	88.5	106.4
120	2.0640	63.2	80.8	106.6
180	2.4288	74.3	69.9	104.6
240	2.6016	79.6	67.0	100.0
360	2.8128	86.1	54.8	112.1
600	2.8377	87.3	34.4	94.1

107.0 (mean)

At 35°C and pH 3.8, the enzyme retains its activity perfectly at least for 10 hours.

As is seen from numbers in the accompanying table, the reaction does not proceed monomolecularly but the hydrolysis stops

* Phenol analysis was made as in the preceding report.

at equilibrium with the opposing reaction. Consequently, the writer attempted to calculate out $k_1K_M+k_2K_M'$ in the manners as below:

If the velocity constants of hydrolysis and synthesis are expressed by k_1 and k_2, affinity constants of phenol β-N-monoacetylglucosaminide and of β-N-monoacetylglucosamine by K_M and K_M' respectively, the total velocity of the simultaneous reactions is

$$\frac{dx}{dt}=k_1K_M(a_1-x)-k_2K_M'(a_2+x). \qquad (1)$$

where a_1 is the initial concentration of the glucoside and a_2 that of the acetylaminosugar.

By rearrangement of terms and integration, we obtain,

$$\frac{1}{t}\{\ln[k_1K_Ma_1-k_2K_M'a_2]-\ln[k_1K_Ma_1-k_2K_M'a_2]$$
$$-x(k_1K_M+k_2K_M')\}=k_1K_M+k_2K_M'.$$

or

$$\frac{1}{t}\left\{\ln\frac{k_1K_Ma_1-k_2K'_Ma_2}{k_1K_M+k_2K_M'}-\ln\left(\frac{k_1K_Ma_1-k_2K_M'a_2}{k_1K_M+k_2K_M'}-x\right)\right\}$$
$$=k_1K_M+k_2K_M'. \qquad (2)$$

At equilibrium, from 1)

$$\frac{dx}{dt}=k_1K_M(a_1-x)-k_2K_M'(a_2+x)=0$$

therefore,

$$K=\frac{k_1}{k_2}=\frac{K_M'(a_2+x)}{K_M(a_1-x)}. \qquad (3)$$

where K denotes equilibrium constant.

Substituting 3) in 2), we get the expression

$$\frac{1}{t}\ln\frac{KK_Ma_1-K_M'a_2}{KK_Ma_1-K_M'a_2-(KK_M+K_M')x}=k_1K_M+k_2K_M'(=C) \qquad (4)$$

in which the quantities on the left side can be determined experimentally.

Furthermore, when C is divided by k_2

$$\frac{k_1}{k_2}K_M+K_M'=\frac{C}{k_2}$$

$$k_2 = \frac{C}{KK_M + K_M'}$$

Thus k_2 and accordingly k_1 also can be calculated out.

Computation of K_M and K_M'

K_m and K_m', the reversals of the affinity constants were calculated out from the degrees of initial hydrolysis which proceeded under the following conditions.

The incubation mixtures were prepared with 1 cc. of a buffered enzyme solution (pH 3.8), 0.5–9 cc. of the phenol β-N-acetylglucosaminide solution containing 10.318 mg in 1 cc. and water which was added till the total volume reached 10 cc.

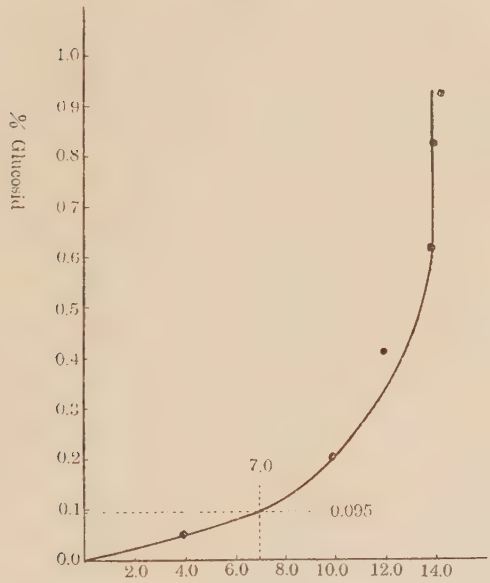
Incubation was begun with mixing the enzyme solution and the requisite diluted substrate solution together, both in advance warmed to just the digestion temperature, and was stopped at definite intervals by pipetting out 2 cc. of the mixture in 18 cc. of an ice cooled trichlopacetic acid solution (70/18%).

In example 2 (Table IV and Fig. 2) the enzyme solution was taken from the same stock as in example 1 (Table III and Fig. 1), but was diluted twice with the buffer solution. Asepsis was held

Table III.
Incubation temperature: 35°C.

Volume of Substrate solution cc.	Conc. of substrate in incub. mixture (c) (gm. in 100 cc.)	Time of incubation min.	Phenol liberated mg.	Decrease of substrate %	$k \cdot 10^4 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \cdot 10^4$	mean	$c \times k.10^4$
9	0.9286	20	0.890	3.03	15.43		14.33
8	0.8254	20	0.878	3.36	17.04		14.06
6	0 6191	10	0.488	2.49	25.33		
		20	0.760	3.87	19.80	22.57	13.98
4	0.4127	10	0.390	2.98	30.16		
		20	0.706	5.40	27.87	29.02	11.98
2	0.2064	5	0.150	2.50	50.65		
		20	0.576	8.80	46.05	48.35	9.98
0.5	0.0516	10	0.128	7.8	81.28		
		20	0.218	13.3	71.39	76.34	3.94

Fig. 1.



$c \times k \,.\, 10^4$

$K_m = 0.95 \div 297 = 0.003189$

as usual by means of a drop of toluene.

According to Michaelis and Miss Menton (1913), all the enzyme present is deemed combined with the substrate at the maximal values of the product k. c. ($14.0/10^4$ and $6.5/10^4$ respectively in the present examples) and the molarities of the substrate at half the maximal values are k_m which were 0.003189 and 0.002861. The mean valus is 0.0030. The affinity constant of the glucoside K_M is, therefore, 333 (=1/0.003).

K_M' was computed by the formula of Euler from the figures obtained by the subsequent experiment and the above numerical values of K_m as well.

For the present purpose, two mixtures were preliminarily digested in parallel, one of which (solution a) was composed of

Buffered enzyme solution (pH 3.8)	3 cc.
Substrate solution containing 10.318 mg in 1 cc.	3 cc.

and the other (solution b), of the enzyme solution, which was taken

Table IV.
Incubation temperature: 35°C.

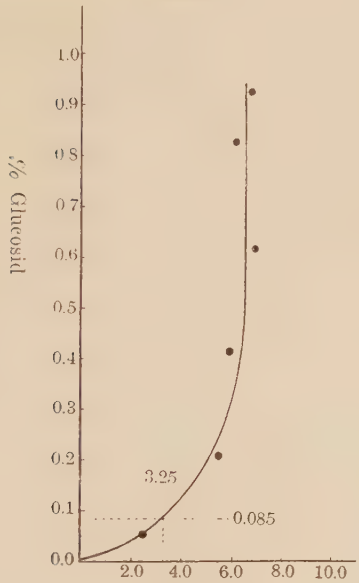
Volume of substrate solution cc.	Conc. of substrate in incub. mixture (c) (gm. in 100 cc.)	Time of incubation min.	Phenol liberated mg.	Decrease of substrate %	$k.10^4\left(=\frac{1}{t}\ln\frac{a}{a-x}\cdot 10^4\right)$		$ck.10^4$
						mean	
9	0.9286	10	0.220	0.74	7.37		
		20	0.380	1.29	6.56		
		30	0.654	2.22	7.45	7.12	6.61
8	0.8254	10	0.168	0.64	6.45		
		20	0.344	1.32	6.91		
		30	0.680	2.60	8.75	7.37	6.08
6	0.6191	10	0.224	1.14	11.28		
		20	0.390	1.99	10.13		
		30	0.670	3.42	11.59	11.00	6.81
4	0.4127	10	0.146	1.11	11.05		
		20	0.440	3.36	17.04		
		30	0.558	4.27	14.59	14.23	5.87
2	0.2064	10	0.176	2.69	27.41		
		20	0.272	4.16	21.19		
		30	0.570	8.72	30.40	26.33	5.43
0.5	0.0516	10	0.080	4.90	50.21		
		20	0.150	9.18	48.13		
		30	0.212	12.98	46.37	48.24	2.49

out of the same stock and identically buffered, and water in similar quantitative relations. The temperature of the thermostat was maintained at 35°C and the digestion was stopped after the lapse of 10 hours, by the end of that time the cleavage of the acetylglucosaminide comes to a stand-still.

Out of both a and b solutions, 4 cc. were then taken out and mixed with 6 cc. of the respective solutions at 35°C which contained 6.325 mg and 10.318 mg of the substrate, so as its total quantities in the new mixtures (solutions A and B) are equal in amount to each other. These were kept still further in the thermostat and increases of free phenols at the 10th and 20th minutes were examined.

Since the cleavage had taken place in mixture a by 87.1%, mixture A contained 13.376 mg [$=30.954\times 0.871$ (fraction cleft) $\times 4/6\times 221/297$] of free N-acetylglucosamine at the outset of incu-

Fig. 2.



$c \times k \cdot 10^4$

$K_m = 0.85 \div 297 = 0.002861$

TABLE V.

Incubation temperature: 35°C.

Kind of incubation	Conc. of substrate n.	Time of incubation min.	Liberated phenol mg.	Decrease of the glucoside %	$k.10^4 \left(= \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \cdot 10^4\right)$
B	0.00347 n. phenol β-N-monoacetylglucosaminide	1		2.2 (by extrapolation)	223.4
		10	0.438	13.4	143.9
		20	0.615	18.8	104.1
A	0.00347 n. phenol β-N-monoacetylglucosaminide + 0.00605 n. β-N-acetylglucosamine*	1		1.4 (by extrapolation)	140.5
		19	0.320	9.8	103.2
		20	0.448	13.7	73.9

* All of N-acetylglucosamine, liberated by the enzyme in solution a, is assumed as remaining as the β-isomer.

bation.

As table V shows, extrapolation gave $v_0 : v = 1.59$. v_0 is the initial velocity in the mixture with the glucoside alone and v that when the cleavage product was present besides.

Thus by calculating according to the Euler's formula (1925):

$$K_m' = \frac{G.K_m}{(M+K_m)\left(\frac{v_0}{v}-1\right)}$$

where

G = conc. of sugar
M = conc. of glucoside,

we obtain

$$K_m' = \frac{0.00605 \times 0.003}{(0.00347 \times 0.003)(1.59-1)} = 0.0048$$

Hence

$$K_M' = \frac{1}{0.0048} = 208$$

Calculation of equilibrium constant K at 35°C from equation 3)

By substituting in equation 3) the values of K_M and K_M' and of x at equilibrium attained by extrapolation (table II), it follows that

$$K = \frac{208 \times 0.00507}{333 \times (0.00579 - 0.00507)} = 4.398$$

From K, K_M and K_M' which have been thus evaluated and x experimentally determined, the numbers in the 5th column of table II were calculated out by equation 4). It is seen that they agree well with one another within experimental errors.

Energy of activation.

Q was computed out by the Arrhenius' formula:

$$k_2 = k_1 e^{\frac{Q(T_2-T_1)}{R.T_1.T_2}}.$$

Example 1.

The enzyme solution was taken from the same stock as in the

example given in table II and the experiments were performed in similar manners at every 5 degrees. The number of minutes at 5% hydrolysis was found out from the results by extrapolation in order to evaluate $k\{=1/t \ln(a/a-x)\}$.

The data are listed in table VI.

The degree of molecular fission arrived at 5% after 9.5, 6.7, 5.0 and 3.5 minutes at 25, 30, 35 and 40°C and the values of $k \cdot 10^4 \{=1/t \ln(a/a-x) \cdot 10^4\}$ were 54.1, 76.6, 102.7 and 146.7 respectively.

Example 2.

Enzyme solution was prepared with another material from that utilized in example 1. Experimental conditions were entirely identical with the above. (table VII).

The mean values of Q between 25° and 40° numbered 34452. At 45° and 50°C the enzyme was inactivated soon, and in example 1 the hydrolysis almost stopped after 2 hours from the commencement of digestion, and in 2, the reaction velocity lowered markedly.

Optimal temperature is therefore 40°C or lies near it. At this temperature no decomposition of the enzyme took place at all during 6 hours of digestion.

3. *Specifity.*

Emulsin is hardly capable of hydrolysing phenol-β-glucosaminide. The test on this point with the present enzyme is desirable. For this purpose, the writer tried but in vain to prepare this substance, attempting inoculation in the course of preparation by means of the specimen which had been kindly sent by Professor B. Helferich to Prof. H. Masamune. Probably the failure was due to the moisture which adhered to the agents while introducing them in the apparatus because the preparation was tried during the rainy season. The effect of β-glucosamine on the hydrolysis of phenol β-N-acetylglucosaminide was thus undertaken to see. If the enzyme were to behave toward β-glucosaminides as toward β-acetylglucosaminides, β-glucosamine would combine the enzyme and depress disintegration of the latter, whereas, as is demonstrated in table VIII, no such influence was detected.

Table VI.

Temperature of incubation °C	Time of incubatoin min.	Degree of cleavage %	$k.10^4\left(=\frac{1}{t}\ln\frac{a}{a-x}\cdot 10^4\right)$	Q
25	9.5 (by extrapolation)	5.0	54.1	
	30	25.0		
	60	26.5		
	120	44.4		33540
	180	56.7		
	240	66.0		
	360	76.0		
30	6.7 (by extrapolation)	5.0	76.6	
	30	20.0		
	60	35.1		
	120	55.7		34920
	180	69.0		
	240	77.2		
	360	86.1		
35	5.0 (by extrapolation)	5.0	102.7	
	Confer table II.			35370
40	3.5 (by extrapolation)	5.0	146.7	
	30	32.3		
	60	51.4		
	120	68.3		
	180	78.3		
	240	83.0		
	360	86.2		
45	30	34.3		
	60	51.0		
	120	73.7		
	180	74.3		
	240	75.2		
	360	75.8		
50	30	31.0		
	60	46.5		
	120	70.9		
	180	71.7		
	240	72.6		
	360	73.2		

TABLE VII.

Temperature of incubation °C	Time of incubation min.	Degree of cleavage %	$k \cdot 10^4 \left(= \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \cdot 10^4\right)$	Q
25	10.5 (by extrapolation)	5.0	48.8	
	30	13.5		
	60	24.1		
	120	40.2		
	180	52.0		32880
	240	60.7		
	360	70.6		
30	7.0 (by extrapolation)	5.0	73.5	
	30	17.8		
	60	31.8		
	120	49.8		
	180	61.8		35050
	240	69.9		
	360	77.7		
35	5.3 (by extrapolation)	5.0	97.0	
	30	23.3		
	60	38.2		
	120	56.6		
	180	67.1		34950
	240	73.5		
	360	79.4		
40	3.5 (by extrapolation)	5.0	146.6	
	30	32.9		
	60	51.4		
	120	68.5		
	180	77.0		
	240	81.6		
	360	84.8		
45	30	28.1		
	60	44.0		
	120	61.5		
	180	70.6		
	240	74.7		
	360	78.1		
50	30	10.7		
	60	20.0		
	120	34.6		
	180	46.1		
	240	54.1		
	360	61.5		

TABLE VIII.

Composition of incubation mixtures:

	Mixture A	Mixture B
Buffered enzyme solution (pH 3.8)	4 cc.	,,
Phenol β-N-acetylglucosaminide solution containing 10.318 mg. in 1 cc.	1 cc.	,,
β-Glucosamine solution containing 10.815 mg. in 1 cc.	0	1 cc.
Water	ad 10 cc.	,,
Toluene	1 drop	,,

Incubation at 35°C.

Time of incubation min.	Phenol liberated mg		Decrease of phenol β-N-acetylglucosaminide %	
	Mixt. A.	Mixt. B.	Mixt. A.	Mixt. B.
10	0.1560	0.1540	4.77	4.71
20	0.2720	0.2720	8.33	8.27
30	0.3640	0.3620	11.14	11.08

SUMMARY.

1. The optimal pH for action of animal β-N-acetylglucosaminidase lies between 3.8 and 4.1. It is not shifted by purification of the enzyme.

2. $k_1K_M+k_2K_M'$ of the reaction is constant throughout the whole stages. The monomolecular formula does not hold.

K, K_M and K_M' at 35°C and Q were 4.398, 333, 208 and 34452. The optimal temperature is 40°C or adjacent to it.

3. The present enzyme is, in all probability, not able to attack β-glucosaminides.

The author wishes to express acknowledgement to the Foundation for Promotion of Scientific and Inustrial Research of Japan for a grant toward the expenses of this work.

REFERENCES.

v. Euler, H. (1925): Chemie der Enzyme, Verlag v. J. F. Bergmann, München. I. 310.

Michaelis, L. und Miss Menton, M. L. (1913): Biochem. Zeits. **49**, 333.

Watanabe, K. (1936, i): Journ. of Biochem., **24**, 299.

,, (1936, ii): Journ. of Biochem., **24**, 283.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 2.

ÜBER XYLENOL-β-d-GLUCOSIDE.

Von

TORAO KITASATO.

(Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät Niigata. Vorstand: Prof. Dr. N. Ariyama.)

(Eingegangen am 22. August 1936)

Der Einfluss der Struktur des Aglucons der β-Glucoside auf die Wirkung des Emulsins wurde schon von Emil Fischer (1919) untersucht. Vor kurzem haben Helferich und seine Mitarbeiter (1934 u. 1935) gezeigt, dass die fermentative Spaltbarkeit von Phenol-β-d-glucosiden durch Substitution im Benzolkern beeinflusst wird.

Um nun über den Zusammenhang zwischen Konstitution des Aglucons und der Spaltbarkeit weitere Aufschlüsse zu erlangen, hat der Autor die β-d-Glucoside der sämtlichen isomeren Xylenole synthetisiert und mit den Phenol- und Kresolglucosiden zusammen die Hydrolysengeschwindigkeit derselben untersucht.

Zunächst wurde die Säurehydrolyse geprüft. Die Xylenolglucoside sind der Leichtigkeit nach in der Reihenfolge von VM; AO; AM, SM; PX; VO spaltbar (siehe Tabelle I). Beobachtet man gleichzeitig die Zerlegbarkeit der Phenol-, Kresol- und Xylenolglucoside, so erhält man die Reihe wie folgt: VM; AO; PK; AM, SM; PX; MK, VO, PH, OK.

Bei der Säurehydrolyse waren die Spaltbarkeitsunterschiede allerdings sehr gering.

Bei der fermentativen Spaltung ist die Reihenfolge ganz anders, nämlich:

Xylenolglucoside: VO; PX; SM, AM; AO; VM und

Phenol-, Kresol- und Xylenolglucoside: OK; VO; PX; SM, AM; MK; AO; PH; PK; VM.

Man kann hieraus nun den Schluss ziehen, dass die Spaltungsgeschwindigkeit der Kresol- und Xylenolglucoside *in jeder Gruppe für sich* bei Säure- und Fermentspaltung eine umgekehrte ist.

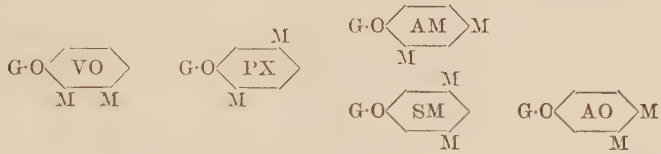
Tabelle I.

β-d-Glucoside von:	Formel u. Abkürzung G = Glucoserest M = CH_3-	Säurespaltung			Fermentative Spaltung		
		t in Min.	Spaltungsgrad in %	K·10⁴	t in Min.	Spaltungsgrad in %	K·10⁴
vic. o-Xylenol	G·O⟨VO⟩ M M	660	41.8	3.6	60	67.3	80.9
p- „	G·O⟨PX⟩ M M	660	43.1	3.7	60	55.2	58.1
asym. m- „	G·O⟨AM⟩M M	660	43.9	3.8	60 120 240	33.3 61.4 89.5	29.3 34.5 40.8
sym. m- „	G·O⟨SM⟩ M M	660	43.9	3.8	60 120 240	42.1 64.9 84.2	39.6 37.9 33.4
asym. o- „	G·O⟨AO⟩M M	660	49.1	4.4	60	8.8	6.7
vic. m- „	G·O⟨VM⟩ M M	660	96.3	21.7	60	0	0
o-Kresol	G·O⟨OK⟩ M	660	40.0	3.4	60	80.0	116.8
m- „	G·O⟨MK⟩ M	660	42.1	3.6	60	14.0	10.9
p- „	G·O⟨PK⟩M	660	45.6	4.0	60	3.7	2.7
Phenol	G·O⟨PH⟩	660	41.8	3.6	60	5.5	4.1

Helferich (l.c.) hat gezeigt, dass die Einführung einer CH_3-Gruppe in Phenol-β-d-glucosid in meta-Stellung (m-Kresolglucosid) die fermentative Spaltbarkeit des Phenolglucosids etwas verstärkt

und in ortho noch stärker fördernd wirkt, dagegen aber in para hemmt. Diese Regelmässigkeit konnte ich auch bei Xylenolglucosiden bestätigen.

Abgesehen vom vic. m-Xylenolglucosid (s. unten) wurden die Xylenolglucoside, die in ortho-Stellung CH_3-Gruppe besitzen, schneller gespalten als diejenigen, die CH_3 in meta-Stellung. Unter den ortho-methylierten Xylenolglucosiden wurde vic. o-Xylenolglucosid, welches die zweite CH_3-Gruppe in meta besitzt, schneller als das ortho-und para-methylierte Glucosid (AM) gespalten; und PX stand in der Mitte.



SM wurde schneller als AO gespalten, da SM das in m, m'-, und AO das in m, p-Stellungen methylierte Glucosid ist.

Eine merkwürdige Tendenz zeigte VM; seiner Konstitution nach könnte man wohl denken, dass es durch Ferment am schnellsten gespalten würde. Dies war aber nicht der Fall, denn sowohl durch Emulsin als auch durch Hefe-maltase wurde es nicht gespalten. Helferich zeigte an zwei Beispielen, nämlich bei AM und VM, die fermentative Spaltung des Xylenolglucosids. Nach seiner Feststellung ist die Spaltbarkeit des AM grösser als die von PK, da AM ein ortho-methyliertes PK ist; dagegen ist aber die Spaltbarkeit von VM kleiner als die von PK, trotzdem VM ein o, o'-methyliertes PH ist. Bei meinem Experimente konnte ich die Spaltung des VM durch Emulsin kaum beobachten, was vielleicht dadurch verursacht war, dass ich Emulsin ohne weitere Reinigung anwandte.

Experimenteller Teil.

Darstellung von Xylenolglucosiden.

Von den zur Synthese der Glucoside verwendeten Xylenolen waren käuflich: asym. m-Xylenol, asym. o-Xylenol und p-Xylenol. Die anderen wurden synthetisiert und zwar sym. m-Xylenol nach

Knoevenagel (1894), vic. *m*-Xylenol nach Bamberger (1903) und vic. *o*-Xylenol aus 3-Nitro-*o*-xylol [Crossley u. Renouf (1909)] über vic. *o*-Xylidin und Diazoniumsalz. Die Xylenole wurden durch Umkrystallisation bzw. Destillation gereinigt.

Um eine gute Ausbeute zu erreichen, habe ich die Glucoside direkt aus Xylenolen und Acetobromglucose dargestellt.

Je 1 Mol von Xylenol und Acetobromglucose wurden in der Kälte in alkoholischer Kalilauge, die 1 Mol KOH enthielte, zusammengebracht, und nach 2–3tägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Flüssigkeit filtriert, mit Barytwasser behandelt und nach dem Einleiten der Kohlensäure filtriert; hierbei hellte sich die Flüssigkeit auf, indem durch $BaCO_3$ die Farbstoffe mit niedergeschlagen wurden. Aus dem Filtrat konnte man nach dem Einengen das Glucosid krystallinisch in einer Ausbeute von ca. 50% d. Th. gewinnen.

Die Glucoside wurden aus Wasser, Alkohol oder Essigester mehrmals umkrystallisiert. Sie sind weisse Nadeln, die sich manchmal sternförmig anordneten, oder faserartig krystallisierten (sym. *m*-Xylenolglucosid), und asym. *o*-Xylenolglucosid schied je nach der Konzentration oft gallertartig aus. Sie schmecken stark bitter und reduzieren die Fehling'sche Lösung nicht. Erhitzt man sie mit Mineralsäuren, so spalten sie sich leicht in *d*-Glucose und die betreffenden Xylenole. Löslichkeit in Wasser: SM sehr schwer, VO ziemlich schwer, und die anderen weniger schwer. Löslich in warmem Alkohol, sehr schwer löslich in heissem Essigester, fast unlöslich in Benzol und Äther.

Spaltung durch Säure und Ferment.

Da die Löslichkeit des sym. *m*-Xylenolglucosids in Wasser ziemlich gering war, wurden alle Versuche in einer Konzentration von m/50 durchgeführt. Bei dieser Konzentration zeigte die Ansatzflüssigkeit nach der vollständigen Spaltung eine Drehung von +0.19° im 1 dm-Rohr.

1. Säurehydrolyse.

Das eingewogene Substrat wurde in warmem Wasser gelöst

Physikalische Konstanten und Analysen.

TABELLE II.

Xylenol-β-d-glucoside	Fp (unkorr.)	Drehung $c = 0.5684$ (in H_2O), $l = 2$, $t = 20–22°$.		Analyse*					
				$C_{14}H_{20}O_6$ Ber.			C% 59.1	H% 7.0,	
				$C_{14}H_{20}O_6 \cdot 1/2H_2O$ „			57.3	7.2.	
		α	$[\alpha]_D$	Subst. (mg)	CO_2 (mg)	H_2O (mg)	Gef.	C%	H%
VO	190–1°	−0.74°	−65.1°	2.668	5.768	1.763		59.0	7.4
				2.852	6.180	1.873		59.1	7.3
PX	170°	−0.78°	−68.8°	3.262	7.064	2.097		59.1	7.2
				2.459	5.300	1.564		58.8	7.1
SM	203–4°	−0.77°	−67.7°	2.790	5.908	1.798		57.4	7.2
				3.531	7.496	2.258		57.8	7.2
AO	173–4°	−0.76°	−66.9°	2.681	5.784	1.721		58.8	7.2
				3.487	7.500	2.213		58.7	7.1

* Die Mikroanalysen wurden im Laboratorium des Herrn Prof. Dr. S. Takei in der Kaiserlichen Universität zu Kioto ausgeführt, wofür ich dem Herrn Prof. Takei und seinem Assistenten, Herrn M. Ōno herzlichst danke.

und bei Zimmertemperatur mit einer gewissen Menge Salzsäure versetzt und mit Wasser auf m/50 gebracht. Die Lösung wurde im verschlossenen Reagenzglas im Wasserbade erhitzt und nach der bestimmten Zeit im 1 dm-Rohr polarimetrisch untersucht.

A. 0.02 m Substrat in 0.04 n HCl, Temp. 100°.

Tabelle III.

Glucoside \ t in St.		0	1/2	1	1 1/2	2	3	4	4 1/2
PH	I*	−0.36	−0.24	−0.16	−0.10	−0.05	+0.04	+0.08	+0.10
	II*	0	21.8	36.4	47.3	56.4	72.7	80.0	83.6
OK	I	−0.36	−0.26	−0.20	−0.14	−0.09	+0.01	+0.08	+0.10
	II	0	18.2	29.1	40.0	49.1	67.3	80.0	83.6
MK	I	−0.38	−0.25	−0.18	−0.12	−0.06	+0.03	+0.10	0.13
	II	0	22.8	35.1	45.6	56.1	71.9	84.2	89.5
PK	I	−0.38	−0.25	−0.18	−0.12	−0.06	+0.02	+0.10	—
	II	0	22.8	35.1	45.6	56.1	70.2	84.2	—
AO	I	−0.38	−0.23	−0.14	−0.07	−0.02	+0.06	+0.12	+0.15
	II	0	26.3	42.1	54.4.	63.2	77.2	87.7	93.0
AM	I	−0.38	−0.24	−0.15	−0.08	−0.02	+0.05	+0.12	+0.14
	II	0	24.6	41.3	52.6	63.2	75.4	87.7	91.2
SM	I	−0.39	−0.25	−0.16	−0.09	−0.04	+0.05	+0.12	+0.15
	II	0	24.1	43.1	51.7	60.4	75.9	87.9	93.1
VO	I	−0.37	−0.26	−0.16	−0.09	−0.04	+0.05	+0.11	+0.14
	II	0	19.6	37.5	50.0	58.9	75.0	85.7	91.1
VM	I	−0.08	+0.07	+0.14	+0.17	+0.18	+0.19	—	—
	II	0	55.6	81.5	92.6	96.3	100.0	—	—
PX	I	−0.39	−0.25	−0.17	−0.12	−0.06	+0.04	+0.11	+0.15
	II	0	24.1	37.9	46.6	56.9	74.1	86.2	93.1

* I: α in Grad, beobachtet im 1 dm-Rohr, II: Zersetzungsgrad in %, auch in den nachstehenden Tabellen.

B. 0.02 m Substrat in 0.032 n HCl, Temp. 77°±1°.

Tabelle IV.

Glucoside \ t in Stund.		0	2	6	11	20
PH	I	−0.36	−0.31	−0.22	−0.13	−0.04
	II	0	9.1	25.5	41.8	58.2
OK	I	−0.36	−0.31	−0.23	−0.14	−0.04
	II	0	9.1	23.6	40.0	58.2
MK	I	−0.38	−0.33	−0.24	−0.14	−0.03
	II	0	8.8	24.6	42.1	61.4
PK	I	−0.38	−0.31	−0.22	−0.12	±0.00
	II	0	12.3	28.1	45.6	66.7
AO	I	−0.38	−0.31	−0.21	−0.10	+0.02
	II	0	12.3	29.8	49.1	70.2
AM	I	−0.38	−0.31	−0.22	−0.13	−0.01
	II	0	12.3	28.1	43.9	64.9
SM	I	−0.38	−0.32	−0.22	−0.13	−0.01
	II	0	10.5	28.1	43.9	64.9
VO	I	−0.36	−0.31	−0.22	−0.13	−0.01
	II	0	9.1	25.5	41.8	63.6
VM	I	−0.08	−0.01	+0.10	+0.18	+0.19
	II	0	26.0	66.7	96.3	100.0
PX	I	−0.39	−0.33	−0.24	−0.14	−0.02
	II	0	10.4	25.9	43.1	63.8

2. Fermentative Spaltung.

Als β-Glucosidase wurde Emulsin von E. Merck benutzt. Die Konzentration der Substrate in Ansatzflüssigkeit war 0.02 m. Alle Versuche wurden bei 30° und pH 5.0 (Acetatpuffer) vorgenommen. Nach der bestimmten Zeit wurde ein Teil der Ansatzflüssigkeit entnommen, mit festem K_2CO_3 abgestoppt und im 1 dm-Rohr die

Drehung gemessen. Die Eigendrehung des Emulsins ist in den Zahlen der nachstehenden Tabellen durch Kontrolle berücksichtigt.

A. 0.025 m Glucosid gelöst in 0.2 m Puffer +1/4 Vol. 0.5%ige Emulsin in 0.2 m Puffer. Als Kontrolle: Substrat + Puffer; Emulsin + Puffer.

Tabelle V.

Glucoside \ t in Min.		0	17	33	59	78	98	120	159
PH	I	−0.36	−0.34	−0.33	−0.32	−0.32	−0.30	−0.29	−0.29
	II	0	3.6	4.3	7.3	7.3	10.9	12.7	12.7
OK	I	−0.36	−0.21	−0.11	−0.02	+0.01	+0.06	+0.09	+0.11
	II	0	27.3	45.4	61.8	67.3	76.4	81.8	85.4
MK	I	−0.38	−0.35	−0.34	−0.31	−0.30	−0.28	−0.27	−0.25
	II	0	5.3	7.0	12.3	14.0	17.5	19.3	22.8
PK	I	−0.38	−0.37	−0.36	−0.35	−0.35	−0.34	−0.34	−0.33
	II	0	1.8	3.5	5.3	5.3	7.0	7.0	8.8
AO	I	−0.38	−0.36	−0.34	−0.33	−0.32	−0.32	−0.31	−0.30
	II	0	3.5	7.0	8.8	10.5	10.5	12.3	14.0
AM	I	−0.38	−0.31	−0.28	−0.22	−0.19	−0.17	−0.12	−0.07
	II	0	12.3	17.5	28.1	29.8	36.8	45.6	54.4
SM	I	−0.39	−0.33	−0·30	−0.25	−0.22	−0.18	−0.14	−0.10
	II	0	10.4	15.5	24.1	29.3	36.2	43.1	50.0
VO	I	−0.37	−0.28	−0.15	−0.09	−0.05	±0.00	+0.07	+0.09
	II	0	16.1	39.3	50.0	59.1	66.1	78.6	82.2
VM	I	−0.08	−0.08	−0.08	−0.08	−0.08	−0.08	−0.08	−0.07
	II	0	0	0	0	0	0	0	+
PX	I	−0.39	−0.32	−0.24	−0.16	−0.12	−0.09	−0.06	−0.01
	II	0	12.1	25.9	34.7	46.6	51.7	56.9	65.5

B. 0.025 m Glucosid in H_2O + 1/10 Vol. 0.4 m Puffer + 3/20 Vol. 1%ige wässrige Emulsinlösung. Kontrolle wie bei A.

Tabelle VI.

Glucoside \ t in Min.		0	60	120	240
PH	I	−0.36	−0.33	−0.28	−0.22
	II	0	5.5	14.5	25.5
OK	I	−0.36	+0.08	+0.15	+0.16
	II	0	80.0	92.7	94.5
MK	I	−0.38	−0.30	−0.23	−0.10
	II	0	14.0	26.3	49.1
PK	I	−0.38	−0.36	−0.33	−0.31
	II	0	3.7	8.8	12.3
AO	I	−0.38	−0.33	−0.28	−0.22
	II	0	8.8	17.6	28.1
AM	I	−0.38	−0.19	−0.03	+0.13
	II	0	33.3	61.4	89.5
SM	I	−0.38	−0.14	−0.01	+0.10
	II	0	42.1	64.9	84.2
VO	I	−0.36	+0.01	+0.12	+0.17
	II	0	67.3	87.3	96.4
VM	I	−0.08	−0.08	−0.08	−0.08
	II	0	0	0	0
PX	I	−0.39	−0.07	+0.05	+0.16
	II	0	55.2	75.9	94.8

LITERATURVERZEICHNIS.

Bamberger, E. (1903): Ber chem. Ges., **36**, 2036.
Crossley, A. W. u. Renouf, N. (1909): Soc., **95**, 208.
Fischer, E. (1919): Z. physiol. Chem., **107**, 176.
Helferich, B., Ernst, H., Streek, R. u. Vorsatz, F. (1935): Ann., **518**, 211.
Helferich, B. u. Philipp, F. (1934): Ann., **514**, 228.
Helferich, B. u. Scheiber, H. (1934): Z. physiol., Chem., **226**, 272.
Knoevenagel, E. (Versuche von Klages) (1894): Ann., **281**, 104, **111**, 121.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

ÜBER DIE WIRKUNG DES HARNS SCHWANGERER FRAUEN AUF DIE SAUERSTOFFATMUNG DES OVARIUMS.

Von

KAN-ICHI KIYOHARA und SHOZŌ IZAWA.

(*Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Universität zu Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. D. Ogata.*)

(Eingegangen am 1. September 1936)

Über die Veränderungen verschiedener Organe in der Schwangerschaft sind viele Untersuchungen veröffentlicht worden. Besonders seitdem Zondek und Aschheim über die Wirkung des Vorderlappenhormons der Hypophyse in der Schwangerschaft auf das Ovarium berichtet haben, wurden die Einflüsse dieses Hormons auf Ovarium, Thyreoidea, Hypophyse, Nebenniere u. a. von vielen Forschern in verschiedenen Gebieten untersucht. Aber die direkte Beobachtung des Stoffwechsels dieser Hormondrüsen selbst in der Schwangerschaft ist bisher leider wenig erforscht. Obwohl die Bestimmung des Stoffwechsels und besonders der Gewebsatmung dieser Organe uns interessiert, sind uns doch bis jetzt fast keine Berichte zu diesem Thema ausserhalb der Untersuchung von Matsushita und Kido bekannt. Fujita hat erstmalig die Gewebsatmung des Ovariums der Maus beobachtet, und darnach haben Lipschütz und Veshnjakov und auch Okabe die Sauerstoffatmung des Ovariums erforscht. Dass das Ovarium auf das sog. Vorderlappenhormon der Hypophyse, welches in der Schwangerschaft sich beträchtlich vermehrt, empfindlich reagiert, interessierte uns und regte uns zur Forschung der Wirkung des Harns schwangerer Frauen auf die Gewebsatmung des Ovariums an.

Versuchsmaterial und Methodik.

Als Versuchsobjekt benutzten wir das Ovarium des gesunden, weiblichen Meerschweinchens, welches etwa 300 g wiegt. Die Her-

stellung der Schnitte des Ovariums scheint beim Meerschweinchen verhältnismässig leichter als bei anderen Tieren.

Das Versuchstier wurde durch Verblutung nach Carotisdurchschneidung getötet und die Schnitte des Ovariums, der Leber und der Nierenrinde wurden in Ringerlösung hergestellt, darauf wurde die Sauerstoffatmung dieser Schnitte bei 38°,5C nach Warburg bestimmt. Von der Leber und Nierenrinde wurden natürlich dünnere Schnitte als Grenzschnittdicke nach Warburg benutzt. Nach Lipschütz und Veshnjakov aber wirkt die Zerschneidung des Ovariums in sehr dünne Schnitte hemmend auf die Gewebsatmung desselben, also wurden etwa 1 mm dicke Schnitte benutzt.

Der zur Injektion benutzte Harn wurde aus einer gesunden schwangeren Frau bekommen, 7–8 ccm pro kg dem Meerschweinchen intravenös injiziert. Am Anfang dieser Arbeit (Juni) befand diese Frau sich im 6. Monat der Schwangerschaft, am Ende (September) im 8. Monat. Diese Arbeit wurde in der Sommerzeit (Zimmertemperatur etwa 25°C–32°C) ausgeführt.

Resultate.

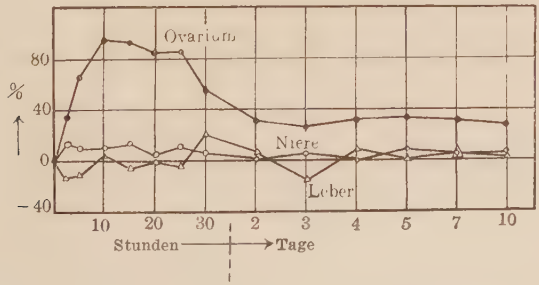
Ovarium. Der Mittelwert der Sauerstoffatmung (Q_{O_2}) der Ovarien von etwa 300 g wiegenden normalen Meerschweinchen beträgt 3,5 cmm (Tab. Ia), dabei besteht kein Unterschied zwischen der linken und rechten Seite. 2–3 Stunden nach der Injektion von Schwangerenurin vermehrt sich die Sauerstoffatmung ziemlich deutlich (Tab. IIa). 5 Stunden nach der Harninjektion beträgt die Atmung 5,8 cmm (Tab. IIIa), also ist die Vermehrung 66%. Die Vermehrung ist am deutlichsten 10 Stunden nach der Injektion (95%, Tab. IVa), ferner zeigt auch die Sauerstoffatmung 15, 20 und 25 Stunden nach der Injektion sehr deutliche Vermehrung (Tab. Va, VIa, und VIIa). Nach 30 Stunden aber vermindert sich die Sauerstoffatmung wieder und beträgt 5,3 cmm (Tab. VIIIa), doch zeigt sie eine deutliche Vermehrung (53%) im Vergleich mit dem Normalwert. 2 Tage nach der Injektion vermindert sich die Sauerstoffatmung weiter (Tab. IXa), sie zeigt nur 27%ige Vermehrung im Vergleich mit dem Normalwert. Ferner zeigt die

Sauerstoffatmung nach 3 Tagen (Tab. Xa), 4 Tagen (Tab. XIa), 5 Tagen (Tab. XIIa), 7 Tagen (Tab. XIIIa) und 10 Tagen (Tab. XIVa) fast gleiche Werte wie nach 2 Tagen, abgesehen von geringeren Schwankungen.

Aus obigen Tatsachen ist ersichtlich, dass die Sauerstoffatmung des Ovariums bereits einige Stunden nach der intravenösen Injektion von Schwangerenharn eine auffallende Vermehrung zeigt und nach 10 bis 25 Stunden am höchsten ist, um nach 30 Stunden bis 2 Tagen sich wieder zu vermindern. Hinsichtlich der makroskopischen Befunde, nämlich der Grösse und Farbe des Ovariums und Uterus nach der Injektion von Schwangerenharn konnte fast keine merkliche Veränderung bemerkt werden.

Leber und Nierenrinde. Die Sauerstoffatmung der Leber nach der Injektion weist ganz unregelmässige Schwankungen (Tab. Ib bis XIVb) auf, welche 20% kaum überschreiten. Hinsichtliche der Nierenrinde kann eine leichte Vermehrung nach einigen Stunden bis 30 Stunden bemerkt werden, welche aber keineswegs ausgeprägt ist. Nach 2 Tagen bis 10 Tagen weist die Sauerstoffatmung fast gleiche Werte wie die der normalen Nierenrinde auf (Tab. Ic bis XIVc).

Die Obenangegebenen Werte der Sauerstoffatmung des Ovariums, der Leber und Nierenrinde können wie die folgende Abbildung zeigt graphisch kurz zusammengefasst werden.



Nämlich, während die Injektion von Schwangerenharn fast keinen Einfluss auf die Sauerstoffatmung der Leber und Nierenrinde ausübt, vermehrt sich die Sauerstoffatmung des Ovariums

nach der Injektion deutlich. Diese Tatsachen zeigen, dass der Stoffwechsel des Ovariums durch das sog. Vorderlappenhormon der Hypophyse im Schwangerenharn auffallend gefördert wird. Nach Matsushita und Kido zeigt die Gewebsatmung der Schilddrüse und Nebenniere in der Schwangerschaft erhebliche Vermehrung, also kann man vermuten, dass der Stoffwechsel der Schilddrüse, Nebenniere u.a., welche mit der Keimdrüse in innigem Zusammenhang stehen, auch durch das Vorderlappenhormon gefördert werden kann. Über das Verhalten dieser inkretorischen Drüsen wird vom Verfasser später berichtet werden.

Die Injektion von Harn der nicht schwangeren Frau übt keinen Einfluss auf die Sauerstoffatmung des Ovariums, der Leber und Nierenrinde aus (Tab. XV und XVI).

Tabelle I a.

Q_{O_2} des normalen Ovariums.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
6/VI	1	390	r.	H	4,92	35,5	0,45	3,24
			l.	G	3,52	30,0	0,41	3,46
8/VI	2	400	r.	H	4,83	38,5	0,45	3,58
			l.	G	3,41	26,0	0,41	3,12
15/VI	4	350	r.	G	3,35	33,0	0,41	4,04
			l.	I	3,84	37,0	0,47	4,52
25/VI	9	280	r.	G	2,95	25,5	0,41	3,54
			l.	H	2,31	14,0	0,45	2,72
29/VI	11	300	r.	H	2,51	14,0	0,45	2,51
			l.	G	2,07	13,0	0,41	2,58
30/VI	12	340	r.	I	4,23	36,5	0,47	4,05
			l.	G	3,84	36,5	0,41	3,89
1/VII	13	280	r.	I	2,40	18,5	0,47	3,62
			l.	G	2,23	21,0	0,41	3,86
3/VII	15	300	r.	I	2,39	19,5	0,47	3,83
			l.	G	2,26	22,0	0,41	3,99
24/VII	26	430	r.	N	2,72	19,5	0,45	3,22
			l.	O	2,63	17,5	0,47	3,12
25/VII	27	510	r.	O	4,83	38,5	0,47	3,74
			l.	N	4,81	26,5	0,45	2,47
						Mittel		3,46 ±0,12 (r. 3,54±0,13 l. 3,37±0,20)

Tabelle I b.

Q_{O_2} der normalen Leber.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
6/VI	1	390	L	6,16	62,0	0,48	4,99
8/VI	2	400	I	4,59	53,0	0,47	5,42
15/VI	4	350	H	8,60	87,5	0,45	4,58
25/VI	9	280	L	4,11	34,0	0,48	3,97
29/NI	11	300	I	3,34	32,0	0,47	4,50
30/VI	12	340	L	5,44	59,5	0,48	5,80
1/VII	13	280	H	7,85	112,5	0,45	6,45
3/VII	15	300	H	4,65	43,0	0,45	4,16
24/VII	26	430	P	3,90	32,0	0,46	3,77
25/VII	27	510	Q	6,56	50,0	0,47	3,58
						Mittel	4,72 ±0,28

Tabelle Ic.

Q_{O_2} der normalen Nierenrinde.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
6/VI	1	390	I	3,56	119,0	0,47	15,71
8/VI	2	400	L	3,06	97,5	0,48	15,29
15/VI	4	350	L	6,01	201,5	0,58	16,09
25/VI	9	280	I	3,04	102,5	0,47	16,14
29/VI	11	300	L	2,32	68,0	0,48	14,07
30/VI	12	340	H	2,71	91,0	0,45	15,11
1/VII	13	280	L	3,53	108,0	0,48	14,69
3/VII	15	300	L	1,91	56,0	0,48	14,07
24/VII	26	430	Q	2,03	57,0	0,47	13,19
25/VII	27	510	P	3,03	92,5	0,46	14,04
						Mittel	14,84 ±0,29

Tabelle II a.

Q_{O_2} des Ovariums 2–3 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
13/VII	22	480	r.	I	5,12	54,5	0,47	5,00
			l.	G	4,17	40,5	0,41	3,98
17/VII	24	340	r.	Q	2,64	28,0	0,47	4,98
			l.	P	2,65	28,0	0,46	4,86
							Mittel	4,71

Tabelle II b.

Q_{O_2} der Leber 2–3 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
13/VII	22	480	H	6,24	58,0	0,45	4,18
17/VII	24	340	O	5,73	46,0	0,47	3,77
						Mittel	3,98

Tabelle II c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 2–3 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
13/VII	22	480	L	3,37	109,0	0,48	15,52
17/VII	24	340	N	3,65	143,0	0,45	17,63
						Mittel	16,58

Tabelle III a.

Q_{O_2} des Ovariums 5 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
5/VIII	30	350	r.	N	2,97	36,5	0,45	5,53
			l.	O	2,91	36,5	0,47	5,89
11/VIII	35	350	r.	N	2,35	26,0	0,47	5,20
			l.	O	2,62	35,0	0,45	6,01
20/VIII	46	310	r.	N	1,92	27,0	0,45	6,32
			l.	O	2,07	24,5	0,47	5,56
							Mittel	5,75

Tabelle III b.

Q_{O_2} der Leber 5 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
5/VIII	30	350	P	2,53	21,0	0,46	3,81
11/VIII	35	350	Q	3,42	27,0	0,47	3,71
20/VIII	46	310	P	3,66	37,0	0,46	4,65
						Mittel	4,06

Tabelle III c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 5 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
5/VIII	30	350	Q	1,71	56,0	0,47	15,39
11/VIII	35	350	P	1,72	62,0	0,46	16,58
20/VIII	46	310	Q	3,19	109,0	0,47	16,05
						Mittel	16,01

Tabelle IV a.

Q_{O_2} des Ovariums 10 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
11/VIII	36	290	r.	N	2,21	32,5	0,45	6,61
			l.	O	2,21	28,0	0,47	5,95
118/VIII	43	300	r.	N	2,73	41,5	0,45	6,84
			l.	O	2,31	30,0	0,47	6,10
9/VIII	44	300	r.	O	2,71	42,0	0,47	7,28
			l.	N	2,80	49,0	0,45	7,87
21/VIII	48	350	r.	O	2,58	36,0	0,47	6,55
			l.	N	2,40	33,5	0,45	6,28
1/IX	52	280	r.	N	2,40	36,5	0,45	6,84
			l.	O	2,48	36,5	0,47	6,91
							Mittel	6,72 ±0,17

Tabelle IV b.

Q_{O_2} der Leber 10 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
11/VIII	36	290	P	2,36	23,0	0,46	4,48
18/VIII	43	300	P	3,72	38,0	0,46	4,69
19/VIII	44	300	Q	6,38	81,0	0,47	5,96
21/VIII	48	350	Q	5,16	54,0	0,47	4,91
1/IX	52	280	P	2,08	23,0	0,46	5,08
						Mittel	5,02

Tabelle IV c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 10 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
11/VIII	36	290	Q	2,62	86,5	0,47	15,51
18/VIII	43	300	Q	1,82	68,0	0,47	17,56
19/VIII	44	300	P	2,10	67,5	0,46	14,78
21/VIII	48	350	P	2,71	94,5	0,46	16,04
1/IX	52	280	Q	1,21	44,5	0,47	17,28
						Mittel	16,23

Tabelle V a.

Q_{O_2} des Ovariums 15 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
16/VI	5	440	r.	I	8,31	124,5	0,47	6,89
			l.	G	8,88	136,5	0,41	6,30
12/VIII	37	310	r.	O	2,68	39,5	0,47	6,92
			l.	N	2,65	41,5	0,45	7,07
22/VIII	49	320	r.	N	4,14	54,5	0,45	5,92
			l.	O	3,05	42,5	0,47	6,54
							Mittel	6,60

Tabelle V b.

Q_{O_2} der Leber 15 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
16/VI	5	440	L	9,17	94,5	0,48	4,95
12/VIII	37	310	Q	4,34	39,5	0,47	4,27
22/VIII	49	320	P	2,43	20,5	0,46	3,88
						Mittel	4,37

Tabelle V c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 15 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
16/VI	5	440	H	3,13	115,5	0,45	16,61
12/VIII	37	310	P	1,61	59,5	0,46	17,00
22/VIII	49	320	Q	1,48	52,5	0,47	16,67
						Mittel	16,76

Tabelle VI a.

Q_{O_2} des Ovariums 20 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
12/VI	3	420	r.	H	8,04	119,5	0,45	6,68
			l.	G	8,74	138,5	0,41	6,49
18/VII	25	290	r.	Q	4,24	54,0	0,47	5,98
			l.	P	4,51	54,5	0,46	5,55
2/IX	53	270	r.	O	2,24	31,0	0,47	6,50
			l.	N	1,88	28,0	0,45	6,70
							Mittel	6,32

Tabelle VI b.

Q_{O_2} der Leber 20 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
12/VI	3	420	L	5,75	58,5	0,48	4,88
18/VII	25	290	N	6,57	70,5	0,45	4,82
2/IX	53	270	Q	2,48	23,5	0,47	4,45
						Mittel	4,72

Tabelle VI c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 20 Stunden nach der Injektion von Schwangernharn.

Datum	Nr.	K.G. (G)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
12/VI	3	420	I	3,32	108,0	0,47	15,28
18/VII	25	290	O	2,86	90,0	0,47	14,79
2/IX	53	270	P	0,95	33,5	0,46	16,22
						Mittel	15,43

Tabelle VII a.

Q_{O_2} des Ovariums 25 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
7/VII	16	530	r.	H	7,13	104,5	0,45	6,60
			l.	G	7,61	127,5	0,41	6,87
6/VIII	31	350	r.	N	3,91	50,5	0,45	5,81
			l.	O	2,56	35,0	0,47	6,35
20/VIII	45	330	r.	O	3,30	43,0	0,47	6,12
			l.	N	2,42	31,5	0,45	5,85
21/VIII	47	280	r.	N	2,88	42,0	0,45	6,56
			l.	O	3,39	49,5	0,47	6,86
							Mittel	6,38

Tabelle VII b.

Q_{O_2} der Leber 25 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
7/VII	16	530	I	6,66	67,0	0,47	4,73
6/VIII	31	350	P	4,51	39,0	0,46	3,97
20/VIII	45	330	Q	3,33	34,0	0,47	4,79
21/VIII	47	280	P	2,81	27,0	0,46	4,41
						Mittel	4,48

Tabelle VII c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 25 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G.	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
7/VII	16	530	L	3,69	122,0	0,48	15,87
6/VIII	31	350	R	2,84	102,5	0,47	16,96
20/VIII	45	330	P	1,27	45,0	0,46	16,29
21/VIII	47	280	Q	1,82	65,0	0,47	16,28
						Mittel	16,48

Tabelle VIII a.

Q_{O_2} des Ovariums 30 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
17/VI	7	360	r.	G	6,61	87,5	0,41	5,43
			l.	H	8,00	103,0	0,45	5,79
12/VIII	38	300	r.	O	2,69	23,5	0,47	4,10
			l.	N	3,09	33,5	0,45	4,87
22/VIII	50	350	r.	N	2,85	38,0	0,45	6,00
			l.	O	2,66	32,0	0,47	5,65
							Mittel	5,31

Tabelle VIII b.

Q_{O_2} der Leber 30 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
17/VI	7	360	I	5,36	72,5	0,47	6,54
12/VIII	38	300	Q	2,22	24,0	0,47	5,08
22/VIII	50	350	P	2,91	35,0	0,46	5,53
						Mittel	5,72

Tabelle VIII c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 30 Stunden nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
17/VI	7	360	L	2,98	84,0	0,48	13,53
12/VIII	38	300	P	2,31	86,0	0,46	17,12
22/VIII	50	350	Q	2,45	91,0	0,47	17,45
						Mittel	16,03

Tabelle IX a.

Q_{O_2} des Ovariums 2 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
8/VII	17	350	r.	I	4,77	50,0	0,47	4,92
			l.	G	4,65	41,0	0,41	3,62
9/VII	18	490	r.	H	7,61	85,5	0,45	5,06
			l.	L	8,10	88,0	0,48	5,21
7/VIII	32	310	r.	N	3,36	32,0	0,45	4,28
			l.	O	3,19	27,5	0,47	4,05
13/VIII	40	300	r.	O	2,86	26,5	0,47	4,35
			l.	N	2,32	23,5	0,45	4,55
							Mittel	4,51

Tabelle IX b.

Q_{O_2} der Leber 2 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
8/VII	17	350	H	5,66	59,0	0,45	4,69
9/VII	18	490	G	6,61	87,5	0,41	5,43
7/VIII	32	310	P	4,32	46,0	0,46	4,89
13/VIII	40	300	Q	3,62	38,5	0,47	4,99
						Mittel	5,00

Tabelle IX c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 2 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
8/VII	17	350	L	2,86	82,0	0,48	13,76
9/VII	18	490	I	3,04	98,5	0,47	15,23
7/VIII	32	310	Q	2,65	84,0	0,47	14,89
13/VIII	40	300	P	2,87	98,5	0,46	15,78
						Mittel	14,92

Tabelle X a.

Q_{O_2} des Ovariums 3 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
9/VII	19	400	r.	G	5,16	43,0	0,41	3,42
			l.	I	5,47	46,5	0,47	3,99
8/VIII	33	300	r.	N	2,52	26,0	0,45	4,64
			l.	O	2,69	27,0	0,47	4,61
14/VIII	41	300	r.	O	2,48	27,0	0,47	5,11
			l.	N	2,49	26,0	0,45	4,69
							Mittel	4,41

Tabelle X b.

Q_{O_2} der Leber 3 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
9/VII	19	400	H	4,82	49,0	0,45	4,57
8/VIII	33	300	P	2,34	16,5	0,46	3,24
14/VIII	41	300	Q	3,17	25,5	0,47	3,78
						Mittel	3,86

Tabelle X c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 3 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
9/VII	19	400	L	2,88	86,0	0,48	14,33
8/VIII	33	300	Q	1,29	45,0	0,47	16,39
14/VIII	41	300	P	1,23	40,5	0,46	15,14
						Mittel	15,29

Tabelle XI a.

Q_{O_2} des Ovariums 4 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
16/VI	6	320	r.	G	4,01	45,5	0,41	4,65
			l.	I	3,76	39,5	0,47	4,93
17/VI	8	360	r.	H	4,26	41,5	0,45	4,38
			l.	G	4,26	40,0	0,41	3,85
15/VIII	42	300	r.	N	2,82	30,5	0,45	4,86
			l.	O	2,55	26,0	0,47	4,79
							Mittel	4,58

Tabelle XI b.

Q_{O_2} der Leber 4 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
16/VI	6	320	H	5,60	87,0	0,45	6,99
17/VI	8	360	L	5,27	40,0	0,48	3,64
19/VIII	42	300	P	6,73	70,0	0,46	4,78
						Mittel	5,14

Tabelle XI c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 4 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
16/VI	6	320	L	2,95	85,0	0,48	13,83
17/VI	8	360	I	2,90	87,0	0,47	14,10
15/VIII	42	300	Q	2,93	101,5	0,47	16,28
						Mittel	14,74

Tabelle XII a.

Q_{O_2} des Ovariums 5 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
27/VI	10	280	r.	I	3,15	28,5	0,47	4,25
			l.	L	3,23	26,5	0,48	3,93
10/VIII	34	300	r.	N	1,91	21,0	0,45	4,94
			l.	O	2,34	25,5	0,47	5,12
27/VIII	51	330	r.	N	2,85	30,5	0,45	4,81
			l.	O	3,58	40,5	0,47	5,31
							Mittel	4,73

Tabelle XII b.

Q_{O_2} der Leber 5 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
27/VI	10	280	G	5,89	80,0	0,41	5,57
10/VIII	34	300	P	3,53	36,0	0,46	4,69
27/VIII	51	330	P	4,18	37,5	0,46	4,12
						Mittel	4,79

Tabelle XII c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 5 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
27/VI	10	280	H	2,30	79,0	0,45	15,28
10/VIII	34	300	Q	1,57	56,0	0,47	16,76
27/VIII	51	330	Q	1,16	40,0	0,47	16,20
						Mittel	16,08

Tabelle XIII a.

Q_{O_2} des Ovariums 7 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
29/VII	29	330	r.	N	5,47	56,0	0,45	4,60
			l.	O	4,42	38,0	0,47	4,04
14/IX	57	300	r.	N	3,48	34,5	0,45	4,46
			l.	O	3,44	35,5	0,47	4,85
14/IX	58	270	r.	O	1,92	18,5	0,47	4,52
			l.	N	2,19	24,0	0,45	4,93
							Mittel	4,57

Tabelle XIII b.

Q_{O_2} der Leber 7 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
29/VII	29	330	Q	4,80	58,5	0,47	5,72
14/XI	57	300	P	5,44	46,5	0,46	3,93
14/XI	58	270	Q	2,64	27,5	0,47	4,89
						Mittel	4,85

Tabelle XIII c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 7 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
29/VII	29	330	P	2,03	62,0	0,46	14,04
14/IX	57	300	Q	3,13	101,0	0,47	15,16
14/IX	58	270	P	2,71	96,0	0,46	16,29
						Mittel	15,16

Tabelle XIV a.

Q_{O_2} des Ovariums 10 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
14/VII	23	460	r.	G	6,30	50,5	0,41	3,28
			l.	I	5,66	56,5	0,47	4,69
17/IX	59	270	r.	N	2,73	28,0	0,45	4,61
			l.	O	2,69	26,5	0,47	4,63
17/IX	60	290	r.	O	1,37	14,5	0,47	4,97
			l.	N	1,64	17,0	0,45	4,66
							Mittel	4,47

Tabelle XIV b.

Q_{O_2} der Leber 10 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr.Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
14/VII	23	460	H	6,48	70,0	0,45	4,86
17/IX	59	270	P	3,05	33,0	0,46	4,97
17/IX	60	290	Q	3,10	30,5	0,47	4,62
						Mittel	4,82

Tabelle XIV c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 10 Tage nach der Injektion von Schwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
14/VII	23	460	L	3,48	99,5	0,48	13,72
17/IX	59	270	Q	1,36	43,5	0,47	15,03
17/IX	60	290	P	2,41	85,5	0,46	16,31
						Mittel	15,02

Tabelle XV a.

Q_{O_2} des Ovariums 10 Stunden nach der Injektion von Nichtschwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
11/VII	21	280	r.	L	2,74	17,0	0,48	2,97
			l.	H	2,33	14,5	0,45	2,80
11/IX	54	510	r.	N	7,93	58,5	0,45	3,31
			l.	O	7,04	53,5	0,47	3,57
12/IX	56	290	r.	O	2,83	22,5	0,47	3,73
			l.	N	2,84	26,0	0,45	4,11
							Mittel	3,42

Tabelle XV b.

Q_{O_2} der Leber 10 Stunden nach der Injektion von Nichtschwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
11/VII	21	280	G	5,60	56,0	0,41	4,10
11/IX	54	510	P	2,65	26,5	0,46	4,60
12/IX	56	290	Q	5,22	52,5	0,47	4,72
						Mittel	4,47

Tabelle XV c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 10 Stunden nach der Injektion von Nichtschwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
11/VII	21	280	I	2,78	85,0	0,47	14,37
11/IX	54	510	Q	2,43	84,5	0,47	16,34
12/IX	56	290	P	2,51	101,0	0,46	18,50
						Mittel	16,40

Tabelle XVI a.

Q_{O_2} des Ovariums 25 Stunden nach der Injektion von Nichtschwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Seite	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
10/VII	20	270	r.	I	2,92	21,5	0,47	3,47
			l.	G	2,59	21,5	0,41	3,40
12/IX	55	300	r.	N	2,47	23,0	0,45	4,19
			l.	O	2,38	20,0	0,47	3,94
							Mittel	3,75

Tabelle XVI b.

Q_{O_2} der Leber 25 Stunden nach der Injektion von Nichtschwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
10/VII	20	270	H	4,59	45,5	0,45	4,46
12/IX	55	300	P	5,29	44,5	0,46	3,86
						Mittel	4,16

Tabelle XVI c.

Q_{O_2} der Nierenrinde 25 Stunden nach der Injektion von Nichtschwangerenharn.

Datum	Nr.	K.G. (g)	Manometer	Tr. Gew. (mg)	Dr. Diff. (mm/St.)	K_{O_2}	Q_{O_2}
10/VII	20	270	L	2,38	66,0	0,48	13,31
12/IX	55	300	Q	2,41	81,0	0,47	15,79
						Mittel	14,55

Zusammenfassung.

1. Nach der Injektion von Schwangerenharn vermehrt sich die Sauerstoffatmung des Ovariums von Meerschweinchen deutlich, und diese Vermehrung zeigt sich 10 bis 25 Stunden nach der Injektion am deutlichsten.

2. Die Sauerstoffatmung der Leber und Nierenrinde zeigt fast keine Veränderung nach der Injektion von Schwangerenharn.

3. Die Injektion von Harn der nicht schwangeren Frau übt keinen Einfluss weder auf die Sauerstoffatmung des Ovariums noch auf die der Leber und Nierenrinde aus.

Literatur.

Fujita, A. (1928): Biochem. Zeitschr., **197**, 175.
Lipschütz, A. und S. Vesnjakov (1930): Pflügers Arch., **223**, 56.
Matsushita, T. und S. Kido (1935): Mitt. aus d. med. Akad. Kioto, **14**, 741.
Okabe, T. (1932): Journ. Kumamoto Med. Soc., **8**, 1323.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DES SOGENANNTEN GEBUNDENEN BLUTZUCKERS.

IV. Mitteilung.

Über die Bedeutung des reticuloendothelialen Systems für den sog, geb. Blutzucker.

Von

YOSHIMASA MATSUOKA.

(*Aus der med. Universitätsklinik von N. Kageura, Nagasaki, Japan.*)

(Eingegangen am 5. September 1936)

Soweit mir bekannt, bietet die Forschung über dieses Gebiet bisher fast nichts ausser den in den Arbeiten von Iizuka und seinen Schülern (1930) angegebenen folgenden Beobachtungen. Bei Typhus abdominalis wird von Kitamura (1927) eine ausnahmslose Steigerung des sog. geb. Blutzuckers, wenngleich der Grad seiner Steigerung je nach der Schwere der Krankheit sowie dem Auftreten oder Fehlen gefährlicher Komplikationen sehr verschieden ist, angegeben. Durch mehrmalige Injektion von Typhusvaccin oder Eieiweiss vermehrt sich der sog. geb. Zucker im Blute und das Maximum der Vermehrung desselben stimmt in der Mehrzahl der Fälle mit dem Maximum des Agglutinationstiters oder Präcipitationstiters überein (Kamada: 1928). Nach Okamoto (1930) ist der Wert des sog. geb. Blutzuckers bei Luetikern oder experimenteller Kaninchenlues grösser als der des Gesunden und diese Vermehrung geht parallel mit dem Grade der Luesreaktion. Auf Grund der oben erwähnten Untersuchungen behaupten sie, dass die Entstehung des sog. geb. Blutzuckers in Beziehung zu der Funktion des reticuloendothelialen Systems steht, weil die Entstehung des Immunkörpers mit dem reticuloendothelialen System zusammenhängt.

Andererseits hat Yano (1929) mitgeteilt, dass beim Kaninchen der sog. geb. Blutzucker durch einmalige Injektion von Tuscheemulsion abnimmt; durch eine bestimmte Anzahl von Tuscheinjektionen

nimmt der Gehalt desselben während der Injektion zu, aber nach Ende der Injektion nimmt er in der Hälfte der Fälle ab, sogar bis zu subnormalen Werten. Ebenfalls hat er bei Durchblutungsversuchen der Milz des Hundes, dem zwei Stunden vorher 5 ccm Tuscheemulsion pro kg intravenös eingespritzt worden war, eine Senkung des sog. geb. Blutzuckers gefunden.

Aus den Ergebnissen der oben beschriebenen Untersuchungen und anderer zahlreicher Arbeiten glaubten Iizuka und seine Schüler (1930) schliessen zu können, dass die Herabsetzung der Funktion des reticuloendothelialen Systems eine Verminderung des sog. geb. Blutzuckers verursacht und infolge der Hyperfunktion dieses Systems es zur Vermehrung desselben kommt.

In meinen vorangehenden Mitteilungen habe ich den Einfluss der Eiweissfettdiät, des Hungers und einiger innerer Sekretionsorgane auf den sog. geb. Blutzucker öffentlich bekanntgemacht. Diese Ergebnisse weckten mein Interesse für die Nachprüfung der Frage, wie bei der Funktionsstörung des reticuloendothelialen Systems der sog. geb. Blutzucker sich verhält.

Um das reticuloendotheliale System zu blockieren, wurde den Tieren eine bestimmte Menge Tuscheemulsion, welche durch Zerreiben von Tuschestäbchen mit 10 facher physiologischer Kochsalzlösung hergestellt wurde, intravenös injiziert.

Zunächst wurde den Tieren 2 ccm Tuscheemulsion pro kg nach 24 stündigem Fasten nur einmal intravenös eingespritzt und danach der Wert des freien sowie des sog. geb. Blutzuckers stündlich 4 Stunden lang vergleichend beobachtet.

Durch einmalige Tuscheinjektion scheint der Wert des freien Blutzuckers mehr oder weniger abzusinken, und der des sog. geb. Blutzuckers nimmt im allgemeinen um ein Geringes ab, um später wieder etwas anzusteigen, kehrt aber bis zum Anfangswerte nicht zurück.

Bei dem zweiten Versuche wurde den Tieren, denen zwei Stunden vorher 2 ccm Tuscheemulsion pro kg intravenös eingespritzt worden war, eine bestimmte Menge Traubenzucker per os dargereicht, um das Verhalten des freien wie auch des sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr zu beobachten.

Tabelle I.

Kontrollversuche.

Nr. des Hundes	Datum	Körpergewicht	fr. Z. od. geb. Z.	Blutzuckergehalt (%) (Ohne Tuscheinjektion)				
				1	2	3	4	5
61	24/VI	kg. 7,4	fr. Z.	0,085	0,081	0,085	0,085	0,079
			geb. Z.	0,114	0,112	0,110	0,112	0,111
62	27/ „	9,3	fr. Z.	0,093	0,094	0,094	0,091	0,093
			geb. Z.	0,097	0,096	0,094	0,096	0,097
63	27/ „	9,1	fr. Z.	0,112	0,098	0,103	0,103	0,098
			geb. Z.	0,102	0,105	0,108	0,111	0,105

Einmalige Tuscheinjektion

Nr. des Hundes	Datum	Körpergewicht	Menge d. Tusche	fr. Z. od. geb. Z.	Blutzuckergehalt (%)					
					Vor der Tusche injekt.	1St. n. d. Tusche-injekt.	2St.	3St.	4St.	5St.
64	18/V	kg. 7,5	cc. 15	fr. Z.	0,106	0,104	0,104	0,104	0,079	0,081
				geb. Z.	0,106	0,087	0,097	0,095	0,097	0,096
65	1/VI	8,9	18	fr. Z.	0,088	0,093	0,089	0,079	0,071	—
				geb. Z.	0,110	0,109	0,107	0,113	0,125	
66	13/ „	9,4	20	fr. Z.	0,093	0,100	0,093	0,075	0,066	—
				geb. Z.	0,134	0,119	0,123	0,128	0,125	

Tabelle II.

Nr. des Hundes	Datum	Körpergewicht	Menge d. Tusche	fr. Z. od. geb. Z.	Blutzuckergehalt (%)				
					Vor der Tusche-injekt.	Vor der Zucker-zufuhr	1St. n. d. Zucker-zufuhr	3St.	3St.
67	5/V	kg. 9,0	cc. (—)	fr. Z.	—	0,086	0,104	0,099	0,072
				geb. Z.		0,115	0,115	0,103	0,115
	15/ „	8,9	18	fr. Z.	0,088	0,091	0,105	0,075	0,081
				geb. Z.	0,101	0,098	0,117	0,104	0,101
68	14/ „	8,2	(—)	fr. Z.	—	0,085	0,107	0,105	0,085
				geb. Z.		0,089	0,092	0,090	0,091
	18/ „	7,8	16	fr. Z.	0,100	0,103	0,124	0,115	0,087
				geb. Z.	0,115	0,102	0,116	0,118	0,131
69	29/ „	11,5	(—)	fr. Z.	—	0,091	0,126	0,115	0,073
				geb. Z.		0,146	0,131	0,141	0,146
	4/VI	11,4	20	fr. Z.	0,088	0,105	0,112	0,102	0,086
				geb. Z.	0,140	0,109	0,128	0,146	0,127
70	11/ „	9,6	20	fr. Z.	0,084	0,079	0,097	0,090	0,084
				geb. Z.	0,126	0,114	0,135	0,133	0,145

Wie die Tabelle II. zeigt, tritt die Hyperglykämie nach Zuckerzufuhr bei vorbehandelten Tieren in demselben Grade auf, wie bei nicht blockierten Hunden, aber der Wert des sog. seb. Blutzuckers scheint nach Zuckerzufuhr in gewissem Masse anzusteigen. Jedoch muss man sich dabei erinnern, dass derselbe Wert, der durch Tuscheinjektion einmal absinkt, auch ohne Zuckerzufuhr wieder etwas anzusteigen pflegt.

Zum Studium der Frage, wie die mehrmalige Injektion von Tuscheemulsion auf den freien sowie den sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr wirkt, wurde den Tieren jeden Tag 2 ccm Tuscheemulsion pro kg drei bis sieben Tage lang intravenös injiziert und am folgenden Tag nach der letzten Injektion der Wert desselben nach Zuckerzufuhr stündlich drei Stunden lang vergleichend untersucht. Ferner, ob die dadurch herbeigeführte alimentäre Veränderung am freien wie auch am sog. geb. Blutzucker durch die Beendigung der Tuscheinjektion beeinflusst wird, wurde auch zweimal nach Ablauf der Injektionsperiode in gleicher Weise beobachtet.

Tabelle III.

Nr. des Hundes	Vor der Tusche-injektion			Nach der Tuscheinjektion				Nach der Ablaufen d. Injekt.		
	Dat.	fr. Z.	geb. Z.	Zahl d. Tusche-injekt	Dat.	fr. Z.	geb. Z.	Dat.	fr. Z.	geb. Z.
71	22/IV	0,086	0,096	3	27/IV	0,076	0,111	6/V	0,081	0,149
72	14/V	0,085	0,089	3	23/V	0,091	0,129	27/ „ 4/VI	0,092 0,082	0,137 0,149
73	27/ „	0,088	0,110	3	5/VI	0,086	0,161	9/ „ 15/ „	0,079 0,090	0,142 0,114
74	22/IV	0,100	0,136	3 7	27/IV 2/V	0,088 0,086	0,142 0,141	6/V 14/ „	0,100 0,084	0,130 0,134
75	23/ „	0,090	0,110	3 7	27/IV 2/V	0,077 0,090	0,121 0,111	8/ „ 14/ „	0,079 0,088	0,120 0,142
76	27/V	0,095	0,131	3 7	5/VI II/ „	0,102 0,088	0,174 0,134	15/VI 20/ „	0,104 0,089	0,129 0,136

Während dieses Versuches bleibt der Nüchternwert des freien Blutzuckers, wie aus Tabelle III. ersichtlich ist, nahezu unverändert, aber der des sog. geb. Blutzuckers steigt am folgenden Tag nach der letzten Tuscheinjektion meistens in gewissem Masse an und nimmt im Laufe der Zeit bald noch weiter zu, bald sinkt er etwas ab; übrigens gelangt er niemals bis zu subnormalen Werten.

Tabelle IV.

a) Nach dreimalige Tuscheinjektion Traubenzucker per os darreicht.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge d. Tr. zuckers		Blutzuckergehalt (%)				Bemerkungen
					fr. Z. od. geb. Z.	Vor der Zuckerzufuhr	1St. n. d. Zuckerzufuhr	2 St.	3 St.	
71	Vor der Tuscheinjektion	22/IV	kg. 7,0	g. 35	fr. Z.	0,086	0,100	0,093	0,084	
					geb. Z.	0,096	0,098	0,100	0,102	
	24/4, 25/4, 26/4 Tusche injiziert	27/ „	6,7		fr. Z.	0,076	0,100	0,104	0,070	
					geb. Z.	0,111	0,117	0,122	0,119	
	Seit 27/4 ohne Tuscheinjektion.	6/V	7,0		fr. Z.	0,081	0,148	0,118	0,072	
					geb. Z.	0,149	0,133	0,157	0,156	
72	Vor der Tuscheinjektion.	14/ „	8,2	40	fr. Z.	0,085	0,107	0,105	0,085	Seit 25/5 Appetit schlecht, seit 29/5 mässig gut
					geb. Z.	0,089	0,092	0,090	0,091	
	18/5, 19/5, 21/5 Tusche injiziert	23/ „	7,6		fr. Z.	0,091	0,137	0,129	0,078	
					geb. Z.	0,129	0,138	0,130	0,139	
	Seit 22/5 ohne Tuscheinjektion	27/ „	7,3		fr. Z.	0,092	0,203	0,163	0,079	
					geb. Z.	0,137	0,148	0,150	0,139	
		4/VI	7,7		fr. Z.	0,082	0,159	0,126	0,070	
					geb. Z.	0,149	0,159	0,158	0,155	
73	Vor der Tuscheinjektion	27/V	8,8	40	fr. Z.	0,088	0,147	0,129	0,061	
					geb. Z.	0,110	0,116	0,122	0,122	
	1/6, 3/6, 4/6 Tusche injiziert	5/VI	8,5		fr. Z.	0,086	0,143	0,128	0,114	
					geb. Z.	0,161	0,176	0,182	0,159	
	Seit 5/6 ohne Tuscheinjektion	9/ „	7,9		fr. Z.	0,079	0,166	0,143	0,083	
					geb. Z.	0,142	0,153	0,144	0,127	
		15/ „	8,2		fr. Z.	0,090	0,144	0,132	0,064	
					geb. Z.	0,114	0,139	0,130	0,127	

Tabelle IV.

b) Nach 7-maliger Tuscheinjektion Traubenzucker per os darreicht.

Nr. des Hundes	Untersuchungsperiode	Datum	Körpergewicht	Menge des Tr. zuckers	fr. Z. od. geb. Z.	Blutzuckergehalt(%) Vor der Zuckerzufuhr	1 St. n. d. Zuckerzufuhr	2 St.	3 St.	Bemerkungen
74	Vor der Tuscheinjektion	22/IV	kg. 7,8	g. 35	fr. Z.	0,100	0,152	0,105	0,103	Seit 29/4 Appetit sehr schlecht, seit 4/5 mässig gut.
					geb. Z.	0,136	0,134	0,139	0,137	
	24/4, 25/4, 26/4, Tusche injiz.	27/ „	7,2		fr. Z.	0,088	0,148	0,121	0,090	
					geb. Z.	0,142	0,150	0,129	0,143	
	28/4, 29/4, 30/4, 1/5 Tusche injiz.	2/V	7,0		fr. Z.	0,086	0,234	0,203	0,099	
					geb. Z.	0,141	0,181	0,174	0,141	
	Nach der Ablauf der Tuscheinjektion	6/ „	7,0		fr. Z.	0,100	0,130	0,127	0,077	
					geb. Z.	0,130	0,163	0,171	0,147	
		14/ „	7,5		fr. Z.	0,084	0,135	0,132	0,091	
					geb. Z.	0,143	0,163	0,161	0,147	
75	Vor der Tusche injektion.	23/IV	12,3	50	fr. Z.	0,090	0,113	0,083	0,094	30/4 Appetit schlecht.
					geb. Z.	0,110	0,102	0,106	0,121	
	24/4, 25/4, 26/4 Tusche injiziert	27/ „	12,7		fr. Z.	0,077	0,152	0,074	0,074	
					geb. Z.	0,121	0,129	0,112	0,119	
	28/4, 29/4, 30/4, 1/5 Tusche injiziert	2/V	12,0		fr. Z.	0,090	0,154	0,086	0,072	
					geb. Z.	0,111	0,135	0,113	0,122	
	Nach den Ablauf der Tuscheinjektion	8/ „	12,5		fr. Z.	0,079	0,114	0,066	0,081	
					geb. Z.	0,120	0,130	0,126	0,118	
		14/ „	12,3		fr. Z.	0,088	0,110	0,075	0,075	
					geb. Z.	0,143	0,180	0,151	0,155	
76	Vor der Tuscheinjektion	27/ „	10,5	50	fr. Z.	0,095	0,159	0,145	0,065	4/6 Appetit schlecht
					geb. Z.	0,131	0,129	0,132	0,121	
	2/6, 3/6, 4/6 Tusche injiziert	5/VI	9,7		fr. Z.	0,102	0,173	0,162	0,172	
					geb. Z.	0,174	0,180	0,179	0,169	
	6/6, 7/6, 8/6, 9/6 Tusche injiziert	11/ „	9,1		fr. Z.	0,088	0,154	0,145	0,077	
					geb. Z.	0,134	0,139	0,151	0,155	
	Nach den Ablauf der Tuscheinjektion	15/ „	9,0		fr. Z.	0,104	0,162	0,130	0,086	
					geb. Z.	0,129	0,131	0,140	0,129	
		20/ „	9,3		fr. Z.	0,089	0,106	0,102	0,097	
					geb. Z.	0,136	0,144	0,154	0,153	

Bei diesem Versuche ist das Verhalten des freien wie auch des sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr aus Tabelle IV. ersichtlich; die Kurve des freien Blutzuckers steigt dabei zuerst stärker als die bei dem Kontrollversuche an, dann wiederum sinkt sie ab und wird schliesslich wieder normal, und dabei nimmt auch der Wert des sog. geb. Blutzuckers einmal deutlich zu, dann neigt er wieder zum Absinken, aber niemals gelangt er bis zu den Anfangswerten. In der letzten Periode kann man keine erheblichen Beziehungen zwischen Ende der Tuscheinjektion und alimentärer Veränderung des freien sowie des sog. geb. Blutzuckers bemerken, weil diese dabei bald leichter und bald stärker als in der Periode der Tuscheinjektion wird. Die oben beschriebenen Ergebnisse, dass nach einmaliger Tuscheinjektion der sog. geb. Zucker im Blute mehr oder weniger abnimmt und durch mehrmalige Tuscheinjektion dagegen zunimmt, stimmen mit den Angaben Yano's (1929) ganz gut überein.

Der Nüchternwert des sog. geb. Blutzuckers nach dem Ablaufen mehrmaliger Tuscheinjektion kehrt im Bereich der Anzahl von Tagen meiner Experimente in meiner Untersuchung bis zu normalen Werten nicht zurück, während nach Yano (1929) er dabei nach und nach abnimmt und schliesslich in der Hälfte der Fälle bis zu subnormalen Werten gelangt. Ob die alimentäre Steigerung des sog. geb. Zuckers im Blute des Hundes, denen eine bestimmte Menge Tuscheemulsion täglich einmal einige Tage lang intravenös eingespritzt wurde, tatsächlich in Beziehung zur Funktionsstörung des reticuloendothelialen Systems steht, die durch mehrmalige Tuscheinjektion herbeigeführt wurde, ist noch fraglich, weil eines der Versuchstiere während der Untersuchungsperiode den Appetit verloren hatte und vielleicht bis zum Hungerzustand gelangt war, wobei nach den in meiner vorangehenden Mitteilung erwähnten Ergebnissen der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr deutlich ansteigt. Aber es ist merkwürdig, dass die alimentäre Steigerung des sog. geb. Blutzuckers nicht nur während der Injektionsperiode, sondern auch während der letzten Untersuchungsperiode andauernd nachzuweisen, ist, wobei von der Injektionsperiode an schon über acht Tage verlaufen waren und bei den

Tieren der Appetit wieder normal geworden war.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen einen zweifelhaften Punkt, nämlich dass der sog. geb. Blutzucker vielleicht durch Reizung des reticuloendothelialen Systems (d. h. einmalige Tuscheinjektion in meinem Versuche) mehr oder weniger abnimmt und bei Herabsetzung der Funktion dieses Systems (d. h. mehrmalige Tuscheinjektion in meinem Versuche) dagegen vielleicht zunimmt, trotz der obenerwähnten gerade entgegengesetzten Ansicht Iizuka's. Zugleich kam mir der Gedanke, dass die Funktion des reticuloendothelialen Systems auch zur alimentären Veränderung des sog. geb. Blutzuckers bei Eiweissfettdiät oder bei Hunger, die schon in meiner vorangehenden Arbeit (1936) mitgeteilt worden ist, in irgendeiner Beziehung stehen mag. Aus diesem Grund habe ich den Kongorotindex, wodurch man nach Adler-Reiman (1925) die Funktion des reticuloendothelialen Systems ersehen kann, bei der Eiweissfettdiät, beim Hungern und bei der Tuscheinjektion zu beobachten unternommen.

Zu diesem Zweck wurde eine Gruppe Tiere, bei denen bereits der Kongorotindex im normalen Zustand beobachtet worden war, mit Eiweissfettnahrung drei Tage lang ernährt, eine Gruppe ein- bis zweiwöchigem Hungern unterzogen, einer Gruppe eine bestimmte Menge Tuscheemulsion täglich einmal 3 Tage lang intravenös injiziert, und danach den Kongorotindex untersucht. Die einzelnen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Wie Tabelle V. zeigt, betrug der Kongorotindex bei normaler Diät 22,3 bis 40,5% bei gesunden Hunden. In dem Kontrollversuche, bei dem jeden dritten Tag der Kongorotindex dreimal untersucht wurde, scheinen die Versuchsresultate meistens nahezu unverändert zu bleiben. Aus dieser Tabelle wird klar, dass der Kongorotindex des Hundes bei Eiweissfettdiät meistens mehr oder weniger abnimmt und beim Hungern in über der Hälfte der Fälle in gewissem Masse zunimmt. Schon von früher ist es bekannt, dass Eiweissfettnahrung auf die Funktion des reticuloendothelialen Systems aktivierend wirkt (zit n. Schröder). Der Kongorotindex der Hunde, denen kohlenhydratreiche gemischte Nahrung einige

TABELLE V.

a) Kontrollversuche

Nr. des Hundes	I.			II.			III.		
	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)
77	7/VIII	9,8	31,6	10/VIII	9,8	30,3	13/VIII	9,8	28,3
78	8/ „	11,8	33,0	11/ „	12,0	36,6	14/ „	11,5	33,4
79	8/ „	10,9	34,5	11/ „	10,5	25,6	14/ „	9,8	35,6

b) Eiweissfettdiät.

Nr. des Hundes	Normale Diät			Eiweissfettdiät			Kohlenhydratzusatz		
	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)
80	9/VII	10,0	37,2	14/VII	9,8	21,1			
81	21/ „	6,0	24,5	27/ „	6,2	17,4	3/VIII	6,5	14,5
82	24/ „	8,0	36,8	28/ „	8,2	22,2	3/ „	8,5	24,3

c) Hunger

Nr. des Hundes	Normale Diät			Einwöchiger Hunger			Normale Diät		
	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)
83	8/VII	8,8	33,2	16/VII	7,7	43,1			
84	18/ „	8,3	40,5	28/ „	6,9	50,4	1/VIII	7,5	26,0
85	20/ „	12,0	24,5	28/ „	9,6	25,9			
86	20/ „	10,5	37,6	29/ „	9,7	34,0			

Nr. des Hundes	Normale Diät			Zweiwöchiger Hunger			Normale Diät		
	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)
87	5/VIII	9,5	36,6	19/VIII	8,3	57,1	22/VIII	8,7	37,4
88	6/ „	8,0	29,4	21/ „	6,5	37,3	24/ „	6,5	26,1

d) Tuscheinjektion

Nr. des Hundes	Vor der Tuscheinjektion			Am folgenden Tag n. d. letzten Tuscheinjek.			Nach Ablauf der Injektionsperiode		
	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)	Dat.	Körp. G. (kg)	Kongorot-index(%)
89	22/VII	8,0	22,5	27/VII	7,5	30,3	31/VII	7,8	25,9
90	22/ „	6,5	22,3	27/ „	6,5	32,0	31/ „	6,5	31,4
91	13/VIII	9,8	28,3	26/VIII	9,5	43,5	30/VIII	9,9	44,0
							5/IX	9,6	30,0
92	18/ „	9,5	23,8	26/ „	9,2	36,6	30/VIII	9,1	43,2
							5/IX	9,1	26,3

Tage lang nach der Hungerperiode gegeben wurde, kehrte in den Fällen, wo beim Hungern derselbe deutlich zunahm, zu normalen Werten zurück, aber der Kongorotindex kehrte in der Periode von Kolenhydratzusatz zu Anfangswerten nicht zurück und überdies war er bisweilen kleiner als der bei Eiweissfettdiät. Wenn die Versuchstiere 2 ccm Tuscheemulsion pro kilo Körpergewicht täglich einmal drei Tage lang intravenös injiziert bekamen, war der Kongorotindex nicht nur am folgenden Tag nach der letzten Tuscheinjektion, sondern auch am 3. Tag nach dem Ende derselben dauernd höher als normal, am 10. Tag danach kam er aber zu Anfangswerten zurück.

Aus diesem Ergebnisse kann man die Tatsache erkennen, dass nicht nur mehrmalige Injektion von Tuscheemulsion, sondern auch ein- bis zweiwöchiger Hunger eine Funktionsstörung des reticuloendothelialen Systems verursachen kann und andererseits durch Eiweissfettdiät diese Funktion mehr oder weniger befördert wird. Wenn die Vermutung mir daher erlaubt ist, dass bei der Hypofunktion des reticuloendothelialen Systems der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr zunimmt und in Folge der Hyperfunktion dieses Systems dagegen abnimmt, so kann man die alimentäre Veränderung des sog. geb. Blutzuckers bei Eiweissfettdiät oder beim Hungern ohne grosse Schwierigkeit wie folgt erklären: Wenn die Tiere mit Eiweissfettdiät einige Tage lang ernährt wurden, wird die Funktion des reticuloendothelialen

Systems dadurch mehr oder weniger befördert und infolgedessen nimmt dabei der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr in gewissem Masse zu. Dagegen wird die Funktion dieses Systems durch ein- bis zweiwöchigen Hunger etwas herabgesetzt und dementsprechend tritt eine Steigerung des sog. geb. Zuckers nach Zuckerzufuhr im Blute auf. Meine Ergebnisse, dass die durch Hunger verursachte alimentäre Steigerung des sog. geb. Blutzuckers durch Wiederverabreichung gemischter Nahrung in relativ kurzer Zeit beseitigt wird, wird in der gleichen Weise erklärt. Für die Erklärung der Tatsache, dass die durch Eiweissfettdiät verstärkte alimentäre Senkung des sog. geb. Blutzuckers durch Kohlenhydratzusatz zur Grundkost vollkommen beseitigt wird, genügt nicht nur das Verhalten des reticuloendothelialen Systems, weil der Kongorotindex dabei niemals zu normalen Werten zurückkehrt.

Auf jeden Fall gehe ich damit einig, dass der sog. geb. Blutzucker mit der Funktion des reticuloendothelialen Systems in Zusammenhang steht, kann jedoch der Erklärung Iizuka's, dass dabei dieses System im weitgehendem Masse an seiner Bildung beteiligt ist, nicht beistimmen, denn es liegt nahe, daran zu denken, dass auf Grund meiner Untersuchung das reticuloendotheliale System die Fähigkeit besitzt, den sog. geb. Zucker zu spalten.

Zusammenfassung.

1. Durch einmalige Tuscheinjektion setzt sich der Nüchternwert am freien wie auch am sog. geb. Blutzucker mehr oder weniger herab.

2. Der sog. geb. Zucker nach Zuckerzufuhr im Blute des Hundes, dem zwei Stunden vorher 2 ccm Tuscheemulsion eingespritzt worden ist, nimmt in gewissem Masse zu.

3. Durch mehrmalige Tuscheinjektion tritt eine Vermehrung des Nüchternwertes am sog. geb. Blutzucker ausnahmslos auf und diese Vermehrung scheint noch am 10. Tag nach der letzten Injektion in der Mehrzahl der Fälle anzuhalten, trotzdem der freie Blutzucker während dieser Untersuchung nahezu unverändert bleibt.

4. Dabei steigt nicht nur der freie, sondern auch der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr deutlich an, um später meistens etwas abzusinken, wenngleich der Grad seiner Steigerung je nach der Schwere der Appetitlosigkeit ziemlich verschieden ist.

5. Der Kongorotindex Adler-Reiman's steigt durch mehrmalige Tuscheinjektion an und diese Erhöhung findet sich noch am 3. Tag nach der letzten Injektion, aber kehrt nach dem 10. Tag vollkommen zurück.

6. Durch Eiweissfettdiät wird der Kongorotindex etwas heragesetzt und durch Kohlenhydratzusatz zur Grundkost scheint diese Abnahme nahezu unverändert zu bleiben.

7. Durch ein- bis zweiwöchiges Hungern nimmt der Kongorotindex in der Mehrzahl der Fälle in gewissem Masse zu und kehrt durch gemischte Nahrung in relativ kurzer Zeit zurück.

Zusammenfassende Betrachtung der I.—IV. Mitteilungen.

Die alimentäre Senkung des sog. geb. Blutzuckers wird durch Eiweissfettdiät, bei welcher der freie Blutzucker nach Zuckerzufuhr erheblich stärker und länger andauernd als bei gemischter Kost auftritt, mehr oder weniger verstärkt und durch Kohlenhydratzusatz zur Grundkost paralysiert, sogar mit Abnahme der alimentären Hyperglykämie. Durch Hunger steigt der Wert des sog. geb. Blutzuckers nach Zuckerzufuhr mit gleichzeitiger Verstärkung der alimentären Hyperglykämie an, aber diese Steigerung kehrt durch kurzfristige Wiederverabreichung kohlenhydratreicher gemischter Nahrung wieder auf den normalen Wert zurück. Bei Blockierung des reticuloendothelialen Systems steigt der Nüchternwert des freien wie auch des sog. geb. Blutzuckers deutlich an und dabei kommt eine erhebliche Steigerung beider Werte nach Zuckerzufuhr zum Ausdruck. Andererseits kann man die Tatsache erkennen, dass die Funktion des reticuloendothelialen Systems durch Eiweissfettdiät mehr oder weniger gefördert und dagegen durch ein- bis zweiwöchigen Hunger etwas herabgesetzt wird. Nach den obengenannten Ergebnissen ist es vielleicht nicht zu viel gesagt, dass der sog. geb. Blutzucker mit der Funktion des reticuloendothelialen Systems in einer gewissen Beziehung steht und

ferner, dass das reticuloendotheliale System an der Spaltung des sog. geb. Blutzuckers vielleicht beteiligt ist. Unter Einfluss von Insulin sinkt der freie Blutzucker ab, dagegen steigt der sog. geb. Blutzucker mehr oder weniger an. Die durch Eiweissfettdiät verstärkte alimentäre Veränderung des freien und des sog. geb. Blutzuckers wird durch Insulineinspritzung eindeutig beseitigt. Auch geben eine Anzahl von Forschern an, dass durch Adrenalineinspritzung der Gehalt an freiem Blutzucker zunimmt und der an sog. geb. Blutzucker dadurch etwas abnimmt, wenngleich in meiner Untersuchung eine solche Abnahme des sog. geb. Blutzuckers nicht gefunden wurde. Nach Nebennierenentfernung (ca über drei Viertel) zeigt der sog. geb. Blutzucker nach Zuckerzufuhr in der Mehrzahl der Fälle eine bemerkbare Steigerung. Auf Grund dieser Untersuchung ist vielleicht die Vermutung erlaubt, dass die Regulierung des sog. geb. Blutzuckers mit dem Pankreas und der Nebenniere (bzw. Insulin und Adrenalin) in irgendeiner Beziehung steht. Aber die Befunde, dass die durch Hunger herbeigeführte alimentäre Steigerung des sog. geb. Blutzuckers durch Insulinverabreichung in gewissem Masse herabgedrückt wird und andererseits nach Totalexstirpation des Pankreas eine starke Steigerung des sog. geb. Blutzuckers gleichzeitig mit einer Steigerung des freien Blutzuckers zum Ausdruck kommt, lassen sich weder aus der Funktion des reticuloendothelialen Systems, noch aus der Pankreas- oder Nebennierenfunktion einfach erklären. Auf jeden Fall habe ich hier nur die quantitativen Veränderungen des sog. geb. Blutzuckers unter verschiedenen experimentellen Zuständen in Betracht gezogen, denn das Problem der chemischen Natur des sog. geb. Blutzuckers wird noch viel Arbeit fordern, ehe man eine einigermassen befriedigende Einsicht gewinnt. Aber die merkwürdige Tatsache, dass der Wert des sog. geb. Blutzuckers durch Zuckerzufuhr und Ernährungszustand, in irgendeiner Beziehung mit der Veränderung des freien Blutzuckers, in bestimmter Weise beeinflusst wird, rief in mir die Vermutung hervor, dass der Vorrat an Reservekohlehydraten nicht nur, wie man meistens denkt, aus Glykogen und Laktoacidogen besteht, sondern hier auch vielleicht chemisch noch unbekannte hydrolysierbare Substanzen d. h. der

sog. geb. Blutzucker eine Rolle spielen. Die noch offene Frage, ob der in erhöhter oder erniedrigter Menge vorhandene sog. geb. Blutzucker bei den verschiedenen Zuständen immer identisch ist, bedarf noch weiterer Untersuchung.

LITERATUR.

Alder, H. u. Fritz Reimann (1925): Zeitschr. f. d. g. exp. Med. **47**, 617.
Iizuka N. (1930): Nippon Naikagakkai Zasshi, **18**, 1.
Kamada, A. (1927–8): Kyoto Huritsuikadaigaku Zasshi, **2**, 1333; **3**, 243.
Kitamura, K. (1927): Kyoto Huritsuikadaigaku Zasshi, **3**, 1469.
Matsuoka, Y. (1936): Journ. of Biochem., **23**, 161.
Okamoto, K. (1930): Mitteil. aus d. med. Acad. zu Kyoto, **5**, 1079, 1090.
Yano, N. (1929): Mitteil. aus d. med. Acad. zu Kyoto, **4**, 185.
Schröder, G. (1933): Neue Deutsche Klinik. Ergänzungsband, 604.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

ÜBER DIE EXTRAKTION DER PHOSPHATASE UND DER CARBOXYLASE DER HEFE.

Von

CHOE KOBAYASHI.

(*Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.*)

(Eingegangen am 21. September 1936)

Der folgende Bericht teilt Untersuchungsresultate über die Extraktion der Phosphatase und der Carboxylase der Hefe mit.

I.

Die Existenz der Phosphoesterase in Hefe ist seit früher bekannt und dieses Ferment nimmt an der Hexosediphosphatbildung und der Hydrolyse der daraus weiter intermediär entstehenden Phosphorverbindungen teil. Wir wissen andererseits, dass die tierische Phosphomonoesterase nicht einheitlich ist und in sich isodyname Typen unterscheiden lässt, die sich gegen P_H verschieden verhalten und weiter von einander getrennt werden können. Die physiologische Bedeutung der Phosphomonoesterase in Betracht ziehend, ist es wünschenswert zu untersuchen, als welcher Typ die Hefephosphatase zu klassifizieren ist.

Pett u. Wynne (1924) haben schon früher beobachtet, dass der Wasserextrakt der getrockneten Bäckerhefe das β-Glycerophosphat bei P_H 4 optimal hydrolysiert. Nach H. u. E. Albers (1935) spaltet die frische Oberhefe dasselbe Substrat optimal bei P_H 3–4.5, ist aber in der neutralen Reaktion unwirksam, dagegen ist die Wirkung der frischen Unterhefe unregelmässig und sie zeigt die Optima bei P_H 3.5 und 6. Aus diesem Resultat haben die Autoren geschlossen, dass die Oberhefe eine Phosphatase, aber die Unterhefe noch eine andere enthält. Sie haben ausserdem eine neue Extraktionsmethode dieses Ferments mitgeteilt; die mit Essigester verflüssigte Oberhefe wird unter Zusatz von Toluol 2–3

tagelang autolysiert, abgeschleuderte Zellreste des Autolysats einigemal mit Wasser gewaschen, nach dem Zusatz mit Grünmalzextrakt 2 Tage lang verdaut und die Lösung dialysiert.

In letzter Zeit hat Schuchart (1936) in Neubergs Institut beobachtet, dass Hansenula javanica 2 isodynamische Phosphatasen enthält, und weiter dass sowohl an frischer Hefe wie auch an der Trockenhefe, Behandlung mit verdünnter Essigsäure die bei PH 6–8.8 wirksame Phosphatase inaktiviert, während durch Ammoniakbehandlung die im sauren Gebiet wirksame Isodyname zerstört wird. Damit ist die Nichteinheitlichkeit der Hefephosphatase in schöner Weise festgestellt worden. Ich habe diesen Befund in dem Versuch mit der aus Bierhefe hergestellten Trocken- und Alkoholhefe bestätigt und konnte weiter die Isodynamen in Lösung bekommen. Das Ergebnis wurde im Juni 1935 in der Versammlung hiesiger Akademie vorgetragen.

Wenn zuerst die Hydrolyse des β-Glycerophosphats mit der bei Zimmertemperatur gegen destilliertes Wasser dialysierten wässerigen Suspension der Trockenhefe oder Alkoholhefe versucht wird, zeigt sich die Hydrolyse zwischen PH 3–9, und es sind 2 Optima bei PH 4 und 8 bemerkbar, während sich ein Minimum bei PH 6 befindet. Diese Tatsache lässt das Vorhandensein von zwei Isodynamen, nämlich der in alkalischer Reaktion aktiven Monoesterase III und der bei PH 3.2 optimal wirksamen Monoesterase I vermuten. Aber in der Hefezelle mag sich die Phosphoesterase noch an die Zellstruktur festgebunden befinden und wenn es der Fall ist, so soll die PH-Abhägigkeit des Ferments, nebst von dem Dissoziationszustand des Ferments, auch von der Membrandurchlässigkeit des Substrats und vom Quellungsgrad des Protoplasma bedingt werden. Daher ist wünschenswert, das Experiment mit der zellfreien Fermentlösung auszuführen. Die Extraktion wurde in folgender Weise gemacht. Die oben erwähnte dialysierte Hefesuspension wurde zentrifugiert und die Spaltung des Glycerophosphats durch die abgeschleuderte Zellmasse und durch die überstehende Lösung gesondert untersucht. Der Bodensatz wirkte bei PH 3–7 fast gleichmässig gut, und war bei abfallender Azidität weniger aktiv, während das klare Zentrifugat, obwohl weniger

wirksam als der Bodensatz, doch zwei deutliche Optima bei P_H 4 und 7 zeigte. Nächstdem wurde die Extraktion durch Bicarbonat unternommen. Sowohl das Zentrifugat als auch der in Wasser suspendierte Bodensatz wurden dialysiert. Bei der Hydrolyse des Glycerophosphats wirkte der dialysierte Bodensatz sehr schwach und zwischen P_H 5–8 fast im gleichen Grade, während die dialysierte überstehende Flüssigkeit wirksamer als der Bodensatz war und ein deutliches Optimum bei P_H 7–8 zeigte. Der nach der Behandelung mit Essigsäure-Acetat (1:1) statt Bicarbonat sonst wie oben dargestellte Bodensatz und Zentrifugat wurden dann untersucht. Dabei wirkte der dialysierte Bodensatz bei P_H 4 optimal, die in alkalischer Reaktion wirksame Phosphatase war soweit inaktiviert worden, dass eine sehr schwache Hydrolyse bei P_H 8 ihr Vorhandensein andeutete. Das aus der Alkoholhefe bekommene dialysierte Zentrifugat war weniger aktiv als die oben erwähnte Bodensatzsuspension, aber es wirkte bei P_H 4 deutlich optimal und in alkalischer Reaktion fast nicht mehr. Der gleiche Extrakt aus der Trockenhefe war sehr schwach. Eine genug starke, saure Phosphatase konnte also durch dieses Verfahren nicht dargestellt werden. Diese Tatsache zeigte die Schwierigkeit der Extraktion der sauren Phosphatase, wie es schon Albers erfahren hat. Mit dem Zweck, die Autolyse der Hefe zu fördern und damit die Extraktion des Ferments zu erleichtern, wurde die Hefe in Essigsäure-Acetatlösung unter Zusatz von Kaliumcyanid digeriert, nach 1 Tage zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit dialysiert. Das Zusetzen des Grünmalzes oder dessen Extrakts nach Albers wurde nicht unternommen, um die Gefahr des Vermischens mit einer Phosphatase von anderer Herkunft zu vermeiden. Die in solcher Weise dargestellte Fermentlösung enthielt die alkalische Phosphatase nicht mehr, sondern die ziemlich starke "saure" Phosphatase, die bei P_H 4 optimal wirkte. Da jedoch eine grosse Menge Phosphatase noch im Extraktionsrückstand zu finden war, wurde die Extraktionsdauer bis zu 5 Tagen verlängert. Die Wirkung der sauren Phosphatase in der extrahierten Flüssigkeit konnte damit stark gesteigert werden. Damit war ich endlich imstande, aus der Trockenhefe und der Alkoholhefe die saure und

alkalische Phosphatase in Lösung zu bekommen.

Es ist ferner nötig, das Optimum dieser 2 Fermente genau zu bestimmen. Als Substrat wurde das leichtspaltbare Monophenylphosphat gebraucht und die Versuchsdauer auf 4 Stunden verkürzt. Als das in der sauren Reaktion wirksame Ferment wurde die durch 2 tägige Extraktion in schwach saurer Reaktion unter Cyanidzusatz bereitete Lösung nach der Dialyse gebraucht. Sie spaltete das Monophenylphosphat bei P_H 3.3 optimal und bei P_H 2.7 war sie ziemlich schwach. Die in dieser Lösung enthaltene Phosphatase müsste daher der Phosphomonoesterase I eingeordnet werden. Die Säureempfindlichkeit dieser Phosphomonoesterase ist also beträchtlich gross. Diese Eigenschaft hat sicher damit zu tun, dass das Optimum der Glycerophosphathydrolyse bei 18 stündigem Versuch als P_H 4 beobachtet wurde. Das in der alkalischen Reaktion wirksame Ferment wurde, wie oben erwähnt, durch die Bicarbonatextraktion dargestellt. Diese Fermentlösung spaltete unter Zusatz von Magnesiumchlorid das Monophenylphosphat optimal bei P_H 8 und die Hydrolyse war bei P_H 9 stärker als bei P_H 7. Diese Tatsache zeigt vielleicht, dass diese Phosphatase dem Typus III angehört. Dass das Optimum sich nicht bei P_H 9 zeigte, kommt wahrscheinlich daher, dass die dargestellte Hefephosphatase III gegen Alkali empfindlich ist. Ferner, um herauszufinden, ob durch die Reinigung die optimale Acidität bis zu P_H 9 verschiebbar ist, wurde die Fermentlösung unter Dinatriumphosphatzusatz mit Eisenhydroxyd geschüttelt. Die dialysierte Adsorptionsrestlösung hydrolysierte Glycerophosphat bei P_H 8 und 9 fast im gleichen Grade.

II.

Für die systematischen Carboxylaseversuche ist die Bereitung der zellfreien haltbaren Fermentlösung oder wasserlöslichen Trockenpulvers und das Einrichten eines einfachen Apparates wünschenswert, der sowohl Ausführung der Versuche als auch Messung der entwickelten Kohlensäure bei konstanter Temperatur ermöglicht. Der von mir gebrauchte Apparat wird in dem experimentellen Teil beschrieben werden. Die Fermentlösung wurde mit

M/2 Essigsäure-Acetat (1:3) gepuffert. Als Substratlösung wurde ein Gemisch von 1 ccm *M*-Brenztraubensäure und 2 ccm *M*-Pyridin gebraucht, P_H war 5.2 und die Alkalisierung durch die Zersetzung des Pyruvinats kann wegen des schwach basischen Charakters des Pyridins vorgebeugt werden. Als die Fermentlösung mit der Substratlösung zusammengemischt wurde, war P_H des Gemisches 5.2–5.4 und selbst nach dem weit fortgeschrittenen Brenztraubensäurezerfall war die Aziditätsverschiebung nur bis zu P_H 5.8–6.

Die Extraktion der Carboxylase wurde zuerst an der aus Bierhefe hergestellten Trockenhefe und Alkoholhefe versucht, aber da die carboxylatische Wirkung schwach war, wurde als Ausgangspräparat "Ebios" gebraucht. Dieses Hefepräparat ist eine aus Bierhefe durch ein patentiertes Verfahren hergestellte Trockenhefe und ich muss der "Dainippon-Bier-Aktiengesellschaft" und "Tanabe Firma", die mir dieses Präparat reichlich geliefert haben, meine herzlichste Dankbarkeit ausdrücken. Das Schönebecksche Experiment (1935), eine haltbare Carboxylaselösung durch die Extraktion der Trockenhefe mit 50%iger Glycerinlösung zu bekommen, wurde von mir nachgeprüft und völlig bestätigt. Der Extrakt, der aus 2 g Trockenhefe durch Zusatz von 10 ccm 50%iger Glycerinlösung dargestellt wurde, zeigte sich aber nach der Zentrifugierung von 20 Minuten (3000 Umdrehungen pro Min.) noch gelblich getrübt, und lieferte erst nach weiterer 10 minutiger Zentrifugierung (7000 Umdrehungen pro Min.) eine leicht opaleszierende Lösung. Diese Lösung wird im folgenden Glycerinextrakt genannt. Der bei der zweiten Zentrifugierung entstandene Bodensatz enthielt eine kleine Menge Hefezellen. Ich habe ausserdem beobachtet, dass bei 3 stündiger Extraktion die Temperaturverschiedenheit wie 37°, 30° oder 20° keinen merklichen Unterschied in der Carboxylasenausbeute verursachte, aber Extraktion bei 50° eine Lösung lieferte, die nur halb so aktiv war wie die bei niedriger Temperatur verfertigte. Auch nach 24–48 stündiger Extraktion im Eisschrank wurde eine gleich wirksame Lösung bekommen wie nach der dreistündigen Extraktion bei 20°. Die im folgenden Versuch gebrauchte Carboxylase ist der 3 stündige Glycerinextrakt, der bei 37° hergestellt wurde. Dieser Extrakt

enthielt eine grosse Menge Eiweissstoff und als dieser gegen 10%ige Rohrzuckerlösung 17 Stundenlang dialysiert wurde, entstand viel Bodensatz, dabei verminderte sich die Wirkung der Carboxylase bis auf 1/3. Falls andererseits 1/2 Volumen von $M/10$ Bleiacetat in 50%iger Glycerinlösung zugesetzt und der entsstandene Bodensatz abzentrifugiert wurde, wirkte die ganz klare gelbliche Lösung carboxylatisch in gleichem Grade wie der Glycerinextrakt selbst. Diese Lösung wird im folgenden Bleisaft genannt. Dieser Bleisaft, falls er bei Zimmertemperatur gegen 1%ige Kalium-chloridlösung dialysiert wurde, wurde desto mehr inaktiviert je mehr die Dialysendauer verlängert wurde; d. h. nach 3–6 Stunden bis zu 2/3 und nach 14–22 Stunden bis zu 1/5. Zusatz von Hefekochsaft steigerte die Aktivität nicht. Als dagegen der Glycerinextrakt oder der Bleisaft gegen 50%ige Glycerinlösung dialysiert und durch Zentrifugieren geklärt wurde, war eine fast unverminderte Carboxylasewirkung nachzuweisen, während sich der abgeschleuderte Bodensatz als unwirksam erwies. Die dialysierte Lösung wurde weiter unter Eiskühlung mit 9 Volumen Aceton versetzt und der Bodensatz durch Behandlung mit Aceton-Äther in Pulver überführt. In 50%igem Glycerin suspendiert, behielt das Pulver aus Glycerinextrakt 73% und das aus Bleisaft 74% des ursprünglichen Wirkungsgrades. Diese Pulver enthielten aber noch eine reichliche Menge von im Wasser oder 50%igen Glycerin unlöslicher Masse. Ausserdem den Glycerinextrakt bis zu Zellfreiheit zu zentrifugieren, ist an sich zeitraubend, Dialysieren gegen Glycerin auch im grossen Massstab praktisch nicht ausführbar und weiter lohnt der grosse Eiweissgehalt der hergestellten Pulver weitere Verarbeitung nicht.

Daher wollte ich eine Fermentlösung von niedrigem Eiweissgehalt darstellen, zwar nach Lebedew durch Mazerieren mit Wasser, aber die Carboxylasewirkung blieb bei den meisten Versuchen nur 1/3 der des Glycerinextrakts. Die Minderwirksamkeit ist vielleicht dadurch verursacht, das die Carboxylase schon während wie auch nach der Extraktion immer inaktiviert wird. Daher wurde die Extraktionsdauer stark verkürzt, so dass 2 g Trockenhefe 10 ccm Wasser zugesetzt, 10 Minuten umgerührt und 10 Minuten (3000

Umdrehungen pro Min.) zentrifugiert wurde. Diese Lösung wird im folgenden Rohwasserextrakt genannt. Sie war noch getrübt und nach weiterer 5–10 minutiger Zentrifugierung (7000 Umdrehungen pro Min.) wurde sie klar mit spuriger Opaleszenz. Diese Lösung wird im folgenden Wasserextrakt genannt. Die Carboxylasewirkung des Rohwasserextrakts, nachdem er durch Glycerinzusatz zu 50% stabilisiert worden war, war fast gleich mit der des oben erwähnten Glycerinextrakts. Da der Wasserextrakt aber beim Carboxylaseversuch in Acetatpuffer schon vor dem Zusatz des Substrats eine starke Trübung zeigte, so wurde die schnelle Extraktion der Trockenhefe durch $M/2$ Essigsäureacetat (1:1) probiert, aber die Carboxylasewirkung dieses Extraktes erreichte nicht einmal 1/4 der des Wasserextrakts. Der Wasserextrakt wurde daher unter Eiskühlung mit 1/2 Volumen Aceton versetzt und zentrifugiert. Der so entstandene Bodensatz heisst Fraktion I. Die überstehende Flüssigkeit war schwach gelb doch ganz klar. Sie wurde weiter nochmals unter Eiskühlung durch Zusatz von 5 Volumen Aceton gefällt, und Fraktion II wurde damit gewonnen. Die beiden Fraktionen wurden ferner durch Aceton-Äther entwässert, als Pulver gewonnen, im Exsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet. Das Gewicht der beiden Pulver war fast gleich und 0.15 g Fraktion I entwickelte in 10 Minuten aus 1 ccm M-Brenztraubensäure 1.25 ccm Kohlendioxyd und die gleiche Menge von Fraktion II 6.0 ccm Kohlendioxyd in derselben Zeitdauer. Daraus ist zu erkennen, dass sich Carboxylase meistenteils in Fraktion II befindet. Das Pulver von Fraktion II löste sich im Wasser ganz klar, wenn es zuerst mit wenig Wasser gut umgerührt und nach Zusatz einer weiteren Menge Wasser zentrifugiert wurde, um jede Spur unlöslicher Masse zu entfernen. Die klare Carboxylaselösung trübte sich während 20–30 Minuten nach dem Zusatz von Acetatpuffer leicht opaleszierend, aber als sie ferner zusammen mit Brenztraubensäure-Pyridin geschüttelt wurde, entstand darin allmählich eine kleine Menge flockiger Eiweisskoagula. Darstellung der Fraktion II von gleicher Aktivität war auch in grossem Massstab ausführbar. Die Wirkung der Fraktion II wurde durch Natriumfluorid um 16% gehemmt, dagegen durch Kaliumoxalat um

16% aktiviert. Oxalatzusatz hat aber mit der Stabilisierung des Ferments nichts zu tun, weil, als die Fermentlösung mit Oxalat oder Fluorid bei Zimmertemperatur liegen gelassen wurde, sich die Wirkung in beiden Fällen nahezu zur Hälfte verminderte. Daraus war zu erkennen, dass das Oxalat die Carboxylase aktivierend beeinflusst. Die Oxalataktivierung und die Fluoridhemmung waren auch am dialysierten Glycerinextrakt zu beobachten. Der Fermentgehalt des wasserlöslichen Carboxylasepulvers ist so gross, dass es vielleicht als ein Ausgangsmaterial der zukünftigen Forschung gebraucht werden kann.

III.

Darauf folgte die Untersuchung des Pulvers (Fraktion II) auf die Phosphoesterase und Pyrophosphatase. Da das Pulver einwenig anorganisches Phosphat enthielt, wurde die wässerige Lösung vor dem Gebrauch dialysiert. Sie zeigte eine sehr schwache Wirkung von Phosphomonoesterase, aber keine von Pyrophosphatase. Bei dem Zusatz von Magnesiumchlorid blieb die Phosphomonoesterasewirkung unbeeinflusst, die Hydrolyse des Pyrophosphats war aber sehr stark und auch die 15 fach verdünnte Fermentlösung übte noch deutliche Hydrolyse aus. Das Optimum dieser Hefepyrophosphatase war bei P_H 7. In der Hefe befindet sich möglicherweise noch eine andere Pyrophosphatase. Denn bei dem Versuch mit dem dialysierten Glycerinextrakt der Trockenhefe wurde noch ein Optimum von P_H 4 ausser P_H 7 beobachtet und weiter wirkte der dialysierte Bleisaft ausschliesslich in saurer Reaktion. Die Forschung darüber soll auf die Zukunft verschoben werden.

Experimenteller Teil.

I. Phosphoesterase der Trockenhefe und Alkoholhefe.

Die Bierhefe wurde von der "Dainippon-Bier-Aktiengesellschaft" freundlich geliefert. Die Trockenhefe wurde daraus durch Ausbreiten der gepressten Bierhefe in dünner Schicht bei Zimmertemperatur bereitet. Zum guten Trocknen bedarf es 4–5 Tage.

Die Bereitung der Alkoholhefe wie üblich. Natrium-glycerophosphat von Merck mit fünf Molekül Krystallwasser. Als Puffer wurde bei PH 2–3.4 $M/10$ Glykokoll-Salzsäure, bei PH 3.6–6 $M/2$ Essigsäure-Acetat, bei PH 7–8 $M/10$ Veronal-Salzsäure und bei PH 9–10 $M/10$ Glykokoll-Natron benutzt. Die Zusammensetzung der Versuchslösung war, wenn nicht besonders angegeben, wie folgt.

Puffer	5.0 ccm
$M/20$ Natrium-glycerophosphat	1.0 „
Fermentlösung	4.0 „

Die fermentative Hydrolyse wurde bei 37° im Brutschrank oder am elektrisch regulierten Wasserbad ausgeführt. Bestimmung des anorganischen Phosphats nach Fiske und Subbarow. Beim Kontrollversuch wurde statt des Substrats Wasser gebraucht und dessen Wert wurde von Hauptversuch abgezogen.

A) Wirkung der dialysierten Suspension von Trockenhefe und Alkoholhefe.

2 g Trocken- oder Alkoholhefe wurde mit 30 ccm Wasser gut umgerührt, in Kollodiumsack mit Toluol überschichtet gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde auf 50 ccm mit Wasser verdünnt.

Tabelle I.

a) Trockenhefesuspension, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.5	3.2	3.9	5	5.6	6	7	7.8	9.1	9.6
%	0	44	50	46	35	35	41	49	31	0

b) Alkoholhefesuspension, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.6	3.1	4.1	5.3	5.6	6	7	7.7	9	9.7
%	1	34	57	52	44	34	59	60	21	3

B) Wirkung des Bodensatzes und der überstehenden Flüssigkeit nach der Dialyse der Hefesuspension.

Die klare überstehende Flüssigkeit wurde auf 50 ccm verdünnt und der Bodensatz 2 mal mit 30 ccm Wasser gewaschen und in 50 ccm Wasser suspendiert.

Tabelle II.

a) Wirkung des Bodensatzes, 18 stündiger Versuch.

Ph	3.2	3.8	5	5.6	6	7	8	8.9	9.6
%	26	25	26	31	28	30	15	9	0

b) Wirkung der überstehenden Flüssigkeit, 18 stündiger Versuch.

Ph	3	3.9	5	5.6	6	7	8	8.9	9.6
%	8	21	11	5	10	12	10	1	0

C) Wirkung der mit Carbonat mazerierten, dann dialysierten Hefe.

2 g Trockenhefe oder Alkoholhefe wurde mit 30 ccm 1%iger Natrium-bicarbonatlösung umgerührt, mit 2–3 ccm Toluol überschichtet, bei 37° 22 Stunden extrahiert. Nach Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit dialysiert und auf 50 ccm verdünnt. Der Bodensatz wurde ebenso nach 2 maligem Auswaschen in 30 ccm Wasser suspendiert, dialysiert und auf 50 ccm verdünnt.

Tabelle III.

a) Wirkung des aus der Trockenhefe wie oben erhaltenen Bodensatzes, 18 stündiger Versuch.

Ph	2	3.2	4.1	5	5.6	6.1	7	8	8.9	9.6
%	0	0	8	9	12	12	13	11	0	0

b) Wirkung der aus der Trockenhefe wie oben dargestellten überstehenden Flüssigkeit, 18 stündiger Versuch.

Ph	2	3.2	4	5	5.6	6.1	7	8	8.9	9.6
%	0	0	0	0	8	40	48	50	21	3

c) Wirkung des aus der Alkoholhefe wie oben dargestellten Bodensatzes, 18 stündiger Versuch.

Ph	2	3.2	3.9	4.9	5.6	6	7	8	8.8	9.3
%	0	0	3	14	19	15	14	21	8	0

d) Wirkung der aus der Alkoholhefe wie oben dargestellten überstehenden Flüssigkeit, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.4	3.2	3.9	5	5 6	6	7	8	9	9.6
%	0	0	0	0	3	16	44	39	17	0

D) Wirkung der mit Essigsäure-Acetat mazerierten, dann dialysierten Hefe.

2 g der Trockenhefe oder Alkoholhefe wurde unter Zusatz von 30 ccm $M/10$ Essigsäure-Acetat (1:1) wie bei C) behandelt und die Bodensatzsuspension und die überstehende Flüssigkeit wurden nach Dialyse zum Versuch gebraucht.

Tabelle IV.

a) Wirkung des aus der Trockenhefe dargestellten Bodensatzes, 17 stündiger Versuch.

Ph	2	3.2	4	5	5.6	6	7.1	7.9	9.1	9.6
%	4	52	57	55	38	23	14	16	10	6

b) Wirkung der aus der Trockenhefe dargestellten überstehenden Flüssigkeit, 19 stündiger Versuch.

Ph	2	3.2	4	5	5.6	6	7.1	7.9	9.1	9.6
%	0	5	5	9	0	2	0	0	0	0

c) Wirkung des aus der Alkoholhefe dargestellten Bodensatzes, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.1	3.3	3.9	5.1	5.7	6.4	6.9	8.2	9.1	9.7
%	0	35	39	38	21	16	9	14	7	0

d) Wirkung der aus der Alkoholhefe dargestellten überstehenden Flüssigkeit, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.1	3.3	4.1	5	5.6	6.4	7	8.1	9	9.7
%	0	8	24	22	6	2	6	5	1	0

E) Wirkung der unter Cyanidzusatz in Essigsäure-Acetat autolysierten Hefe.

M/2 Essigsäure-Acetat (1:1) wurde mit 0.5%iger KCN-Lösung, die mit Salzsäure gegen Methylrot neutralisiert wurde, 5 fach verdünnt. 2 g Trockenhefe wurde mit 30 ccm Cyanid-Acetatpuffer 20 Stunden extrahiert und weiter wie bei C) behandelt.

Tabelle V.

a) Wirkung des aus der Trockenhefe dargestellten Bodensatzes, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.1	3.2	4	5	5.6	6	7	8.1	8.9	9.8
%	5	46	57	58	39	26	12	13	4	11

b) Wirkung der aus der Trockenhefe dargestellten überstehenden Flüssigkeit, 18 stündiger Versuch.

Ph	2.3	3	3.9	5	5.6	6.1	6.9	8.1	9.1	9.7
%	0	19	28	23	1	0	0	0	0	0

c) Wirkung der dialysierten überstehenden Flüssigkeit, die aber durch Verlängerung der Extraktionsdauer (124 Stunden) dargestellt wurde, 18 stündiger Versuch.

Ph	2	3	3.9	5	5.7	6	7	8	9	9.7
%	0	20	41	28	5	0	0	0	0	0

F) Phenylphosphathydrolyse durch die Phosphomonoesterase I der Hefe.

Das Ferment war das wie bei E) hergestellte Zentrifugat. Die dialysierte Esteraselösung wurde auf 25 ccm verdünnt. Die Zusammensetzung der Versuchslösung war wie folgt.

Puffer	6.5 ccm
M/20 Monophenylphosphat	1.0 „
Fermentlösung	2.0 „
N/10 HCl	0.5 „

Versuchsdauer: 4 Stunden.

Tabelle VI.

Ph	2.7	3.2	3.3	3.6	3.8
%	11.6	23.2	29.6	26 4	25.8

G) Phenylphosphathydrolyse durch Phosphomonoesterase III der Hefe.

Die Fermentlösung wurde wie bei C) durch Carbonatextraktion hergestellt. Die Versuchslösung bestand aus:

Puffer	4.0 ccm
M/20 Monophenylphosphat	1.0 „
M/100 $MgCl_2$	1.0 „
Fermentlösung	4.0 „

Tabelle VII.

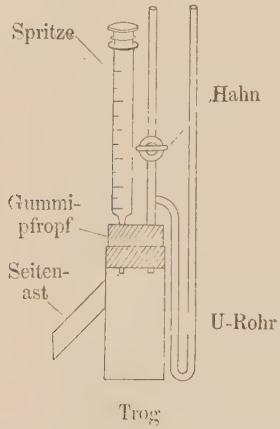
Versuchsdauer: 4 Stunden.

Ph	2.2	3.2	3.9	5	5.6	6	6.9	8	9	9.7
%	0	0	0	0	7	4	23	40	33	19

II. Die Carboxylase der Trockenhefe.

Beim Versuch über die Carboxylasewirkung wurde das gebildete Kohlendioxyd mit dem hier beschriebenen Apparat volumetrisch gemessen. Der Apparat besteht, wie aus der beistehenden

(Scehma des Apparates)



Figur ersichtlich, aus einem Trog mit einem Seitenast, aus einer Spritze, und einem oben mit Hahn versehenen geraden Rohr, an dem das U-Rohr eingeschmolzen ist. Das U-Rohr wird mit Nelkenöl als Sperrflüssigkeit gefüllt. Die Spritze ist eine speziellförmige "Maruko" Pumppipette von Kôshin-sha, Hongo, Tokyo, die ich absichtlich zur Einrichtung des Apparats kurz abgeschnitten habe. Der Glaszylinder der Spritze wird von 0 bis 5 ccm graduiert, 1 ccm in 1/20 geteilt. Die Spritze und das gerade Rohr können mit dem Trog durch Gummipfropf luftdicht verbunden werden. Der Rauminhalt des Trogs beträgt ca 50 ccm, der des Seitenastes ca 10 ccm. Der Verbindungswinkel des Seitenasts mit Trog macht 45°. Zuerst wurden 4 ccm $M/2$ Essigsäure-Acetatpuffergemisch (1:3) und die zu untersuchende Fermentlösung in den Trog, das Gemisch von 1.0 ccm M-Brenztraubensäure und 2.0 ccm M-Pyridin in den Seitenast hineingetan und der Trog wurde mit dem Gummipfropf verbunden. Der ganze Apparat wurde, der Hahn in aufgedrehter Stellung, in elektrisch reguliertes Wasserbad (37°) bis zum oberen Ende der Spritze und oberhalb des Hahns eingetaucht. In 25 Minuten ist der Temperaturausgleich beendet, der durch die Beobachtung des Oelniveaus bei geschlossenem Hahn zu versichern ist. Während dessen wurde der Apparat von Zeit zu Zeit geschüttelt und zwar vorsichtig in der Richtung senkrecht zu der Fläche, die die Achse des Seitenasts und den Mittelpunkt des Trogs enthält. Damit ist die Vorbereitung beendet und der Apparat in Ordnung. Der Apparat wird geneigt, um die Substrat-Pyridinlösung in den Trog hineinlaufen zu lassen und nachher gut geschüttelt. Je nachdem sich CO_2 bildet, wird die Höhe des Oelniveaus verschieden, die durch Ausschieben des Spritzenstempels wieder ausgeglichen wird. Man liest den Stand des Stempels, wodurch die Entwicklung von

CO_2 zeitlich verfolgt werden kann. Während des Versuchs wird der Apparat leicht geschüttelt. Wenn die Vermehrung des Gasvolumens 5.0 ccm erreicht, wird der Hahn aufgedreht und zugleich wird der Stempel schnell bis zur Mark 0 ccm eingedrückt, und nach nochmaligem Zudrehen des Hahns wird die weitere CO_2-Bildung beobachtet. In den folgenden Tabellen wird CO_2 in ccm angegeben, die unter den oben erwähnten Bedingungen durch die einem bestimmten Gewicht Ebios entsprechende Fermentlösung in 10 Minuten entwickelt wurde. 4.0 ccm Glycerinextrakt (=0.8 g Ebios), 5.0 ccm Bleisaft (=0.67 g Ebios) oder 6.0 ccm Wasserextrakt (=1.2 g Ebios) habe ich zum Versuch gebraucht. Die Veränderung des Luftdrucks wurde nicht eingerechnet.

A. Versuch über die Carboxylasewirkung mit dem Glycerinextrakt.

Darstellung des Glycerinextrakts.

2 g Trockenhefe (Ebios) wurde mit 10 ccm 50%iger Glycerinlösung gut umgerührt und, wenn sonst nicht angegeben, bei 37°3 Stunden extrahiert. Selbstgärung war lebhaft. Nach 20 Minuten Zentrifugieren (3000 Umdrehungen pro Min.) wurde 4.2–5 ccm einer gelblichgetrübten Lösung gewonnen. Sie wurde weiter 10 Minuten (7000 Umdrehungen pro Min.) zentrifugiert. Der so dargestellte Glycerinextrakt war klar und leicht opaleszierend. 4 ccm Glycerinextrakt wurde in den folgenden Versuchen gebraucht. Aktivität der Carboxylase war bei wiederholten Darstellungen praktisch gleich.

1. *Haltbarkeit des Glycerinextrakts im Eisschrank.*

Sofort	11.3 ccm
Nach 7 Tagen	10.0 „
Nach 140 Tagen	3.65 „

2. *Einfluss der Extraktionstemperatur und Extraktionsdauer.*

Tabelle VIII.

Extraktionstemperatur	Extraktionsdauer	CO_2
20	3 Stdn.	10.35 ccm
30	3 „	9.05 „
50	3 „	4.75 „
im Eisschrank	24 „	9.75 „
„	48 „	10.75 „

3. *Wirkung des gegen 50% Glycerin dialysierten Glycerinextrakts.*

Der bei der Dialyse entstandene Bodensatz wurde abgeschleudert und die überstehende Lösung wurde auf Carboxylase untersucht. Entwickelte CO_2-Menge war 11.05 ccm.

4. *Wirkung des Bleisafts.*

Der Glycerinextrakt aus 2 g Trockenhefe wurde mit 1/2 Volumen von $M/10$ Bleiacetat in 50%iger Glycerinlösung zugesetzt und von dem Niederschlag abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit (Bleisaft) betrug 5.5 ccm und war gelblich und ganz klar. P_H der Lösung war 5.2. Wirkung des Bleisafts war 1) 9.50 ccm, 2) 7.05 ccm.

5. *Wirkung des dialysierten Bleisafts.*

Der gegen 50% Glycerin dialysierte Bleisaft entwickelte 8.35 ccm CO_2. Als der Saft aber gegen 1% KCl dialysiert wurde, war die gebildete CO_2 wie folgt.

Tabelle IX.

Dauer der Dialyse	3 Stdn.	6 Stdn.	14 Stdn.	22 Stdn.
CO_2	6.00 ccm	5.65 ccm	2.00 ccm	2.00 ccm

6. *Wirkung des durch Acetonzusatz aus dem Dialysat des Glycerinextrakts oder des Bleisafts dargestellten Pulvers.*

Der aus 2 g Trockenhefe dargestellte Glycerinextrakt und

Bleisaft wurden gegen 200 ccm 50%ige Glycerinlösung 20 Stunden dialysiert und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde unter Eiskühlung mit 9 Volumen Aceton versetzt und wieder zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mittels Aceton und Äther getrocknet, in 50%iger Glycerinlösung suspendiert und zum Versuch gebraucht. Das Pulver aus Glycerinextrakt und Bleisaft bildete 8.30 resp. 7.05 ccm CO_2.

B. Versuch über die Cabroxylasewirkung des Wasserextrakts.

2 g Trockenhefe (Ebios) wurde mit 10 ccm Wasser gut umgerührt und bald darauf 20 Minuten (3000 Umdrehungen pro Min.) zentrifugiert. Die so erhaltene Lösung war gelblich und getrübt. Dieser Rohwasserextrakt wurde weiter 5–10 Minuten (6000–7000 Umdrehungen pro Min.) zentrifugiert. Der nur wenig opaleszierende Wasserextrakt betrug 6 ccm. Der bei der zweiten Zentrifugierung entstandene Bodensatz enthielt eine kleine Menge Hefezellen. Der frische Wasserextrakt entwickelte 8.65 ccm CO_2, aber nach 7 Tagen Aufbewahrung im Eisschrank war er unwirksam.

1. Wirkung des im Eisschrank mit Wasser extrahierten Safts.

2 g Trockenhefe wurde in 10 ccm Wasser mit einigen Tropfen Toluol im Eisschrank 18 Stunden extrahiert, dann zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit wurde angewandt. 7.10 ccm CO_2.

2. Wirkung des mit Essigsäure-Acetatlösung extrahierten Safts.

2 g Trockenhefe wurde mit 10 ccm $M/2$ Essigsäure-Acetatlösung (1:1) umgerührt und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit bildete 2.50 ccm CO_2.

3. Wirkung des dialysierten Wasserextrakts.

Der Wasserextrakt wurde gegen 2000 ccm destilliertes Wasser 24 Stunden dialysiert. Das Dialysat entwickelte 1.45 ccm CO_2. Als die dialysierte Lösung mit Hefekochsaft gemischt wurde, war

die CO_2-Bildung 4.55 ccm, während der Kochsaft allein sich als unwirksam erwies. Der Kochsaft wurde dargestellt, indem 2 g Trockenhefe mit 10 ccm Wasser umgerührt, im siedenden Wasserbad 5 Minuten erhitzt und dann zentrifugiert wurde. Die ganze Menge des klaren Zentrifugats wurde angewandt.

4. *Fraktionierung des Wasserextrakts.*

Der Wasserextrakt wurde auf die oben erwähnte Weise dargestellt. Diese Lösung wurde unter Eiskühlung mit 3 ccm Aceton versetzt und zentrifugiert. Der dabei entstandene Bodensatz ist Fraktion I. Die überstehende Flüssigkeit war gelblich und ganz klar. Sie wurde dann in der Kälte mit 30 ccm Aceton versetzt und wieder zentrifugiert. Der Niederschlag ist Fraktion II. Die Fraktion I und II wurde durch Aceton-Ätherbehandeln in Trockenpulver überführt und im Exsikkator aufbewahrt. Fraktion I betrug 0.15 g und Fraktion II 0.145 g. Das Pulver wurde zuerst mit einigen Tropfen Wasser umgerührt, dann 5 ccm Wasser darauf gegossen und zentrifugiert. Die unlösliche Masse war sehr gering. Die so erhaltene Fermentlösung war ganz klar und schwach gelblich. Fraktion I bildete 1.25 ccm CO_2 und Fraktion II 6.00 ccm. Die Fraktion II wurde im grossen Masstab aus 20 g Ebios bereitet. Sie wog 1.83 g. 0.18 g Pulver entwickelte 6.25 ccm CO_2. Nach 26 Tagen Aufbewahrung war die CO_2-Bildung 5.35 ccm.

5. *Einfluss des Oxalats und Fluorids auf die Carboxylase der Fraktion II.*

1 ccm 1% Oxalat oder Fluorid wurde zugesetzt.

Mit Oxalat-Zusatz	5.65 ccm
Mit Fluorid-Zusatz	4.15 „
Ohne Zusatz	4.85 „

III. Versuch über die Phosphoesterase und Pyrophosphatase der Fraktion II.

Die Pufferlösung, das Substrat und die Methode der Phosphorbestimmung waren wie oben erwähnt. Wässerige Lösung der Fraktion II (0.23 g in 20 ccm) wurde bis zu P-Freiheit dialysiert. Die Versuchslösung bestand aus: 5.0 ccm Puffer, 1.0 ccm $M/20$

Glycerophosphat oder $M/40$ $Na_4P_2O_7$, 1.0 ccm Fermentlösung und 2.0 ccm Wasser, ausserdem 1.0 ccm $M/20$ $MgCl_2$ oder 1.0 ccm Wasser.

Tabelle X.

Versuchsdauer: 2 Stunden.

Ohne Mg-Zusatz	Phosphomonoesterase	Ph	4.3	7	8.3
		%	3	4	3
	Pyrophosphatase	Ph	3.9	7	8.2
		%	0	1	0
Mit Mg-Zusatz	Phosphomonoesterase	Ph	4.1	7	8.2
		%	1	0	4
	Pyrophosphatase	Ph	4.1	7	8.4
		%	0	100	100

Da die Pyrophosphatasewirkung bei Mg-Zusatz sehr stark war, wurde die Fermentlösung mit Wasser verdünnt und die Versuche wiederholt.

Tabelle XI.

Ph wurde nach dem Versuch elektrisch ermittelt.

Verdünnungsgrad	Versuchsdauer								
1	2 Stdn.	Ph	3.08	4.08	5.07	5.95	7.03	8.06	8.28
		%	0	0	31	98	99	93	92
1/5	2 Stdn.	Ph	2.92	3.97	5.08	5.77	6.87	8.45	8.65
		%	3	3	10	100	95	74	71
1/15	2 Stdn.	Ph				5.68	6.89	7.92	8.92
		%				29	51	41	37

LITERATUR.

Albers, H. u. Albers, E. (1935): Z. f. Physiol. Chem., **235**, 47.
Pett, L. B. u. Wynne, A. H. (1934): Biochem. J., **28**, 365.
Schoenebeck, Otto v. (1935): Biochem. Z., **275**, 330.
Schuchart, W. (1936): Biochem. Z., **285**, 448.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

ÜBER DIE FERMENTATIVE LYSOLEZITHIN-BILDUNG.

Von

KONOSUKE OGAWA.

(*Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie zu Chiba. Director: Prof. Dr. S. Akamatsu.*)

(Eingegangen am 21. September 1936)

Lezithin ist der Diglyceridphosphorsäurecholinester und das lezithinspaltende Ferment wird gewöhnlich Lezithase genannt. Aber seine Hydrolyse kann überhaupt sowohl an dem Glyceridrest unter Abspaltung der Fettsäure mit der gleichzeitigen Lysolezithinbildung wie auch an dem Phosphorsäureesteranteil stattfinden. Der Glyceridabbau und die Dephosphorierung werden jedoch durch wesentlich verschiedene Fermente katalysiert, daher sollen der Glyceridabbau und die Dephosphorierung wesentlich ganz getrennt behandelt werden. Über die Dephosphorierung des Lezithins sind schon viele Angaben vorhanden, und kürzlich hat Udagawa (1935) festgestellt, dass das Lezithin durch die Phosphodiesterase hydrolysiert wird, und zwar durch die Taka-Diesterase unter Abspaltung des Phosphorsäurecholinesters, und durch die Habu-Diesterase unter Abspaltung des Cholins, und der entstandene Monoester, Glyceridphosphorsäure oder Cholinphosphorsäure, durch die Phosphomonoesterase weiter dephosphorierbar ist. Andererseits, seitdem Delezenne und Fourneau (1914) berichtet haben, dass das Lysolezithin aus dem Lezithin durch das Kobragift geliefert wurde, sind auch viele Untersuchungen über das lysolezithinbildende Ferment angestellt worden.

Die Existenz der sog. Lezithase beschränkt sich nicht auf die Schlangengifte. Im Jahre 1932 waren Belfanti und Arnaudi im Stande, eine "Pankreas-Lezithase", die Lysolezithin liefert, aus Pferdepankreas herzustellen.

Im Zusammenhang mit dem Studium im hiesigen Institut über die phosphatatische Hydrolyse des Lezithins hat der Verfasser

unter Leitung von Prof. Akamatsu die fermentative Lysolezithinbildung untersucht. Zuerst habe ich das Ferment aus Pferdepankreas dargestellt, das Ferment war aktiv, aber bei der Darstellung wurden solche Unbequemlichkeiten erfahren, wie 1) das Einengen des Wasserextrakts wurde wegen des grossen Eiweissgehalts durch starkes Schäumen erschwert, 2) bei wiederholtem Auflösen und Alkoholfällen blieb jedesmal eine mässige Masse ungelöst und das endlich erfolgte schuppige Präparat war zwar vollständig löslich doch nur langsam und seine Wirkung war nicht so stark wie erwartet. Daher wurde das Darstellungsverfahren, wie im experimentellen Teil angegeben, etwas modifiziert, und ein leicht lösliches Pulver wurde hergestellt, dessen lysolezithinbildendes Vermögen sehr stark war. Die folgenden Versuche wurden mit diesem Präparat ausgeführt.

Zuerst habe ich das Ferment auf 0.125% Lezithin in physiologischer Kochsalzlösung bei P_H 7.0 einwirken lassen. Nach einstündiger Fermenteinwirkung zeigte die Hydrolysemischung, die das Ferment in 0.033% enthielt, solch starke hämolytische Eigenschaft, dass sie, mit gleichem Volumen 2% Erythrocytensuspension gemischt, die Zellen schon in 2 Minuten vollständig löste. Nach 3 Stunden erzeugte das Ferment selbst in 0.008% Endkonzentration so viel Lysolezithin, dass die Erythrocyten unter gleicher Bedingung schon in 5 Minuten komplett aufgelöst wurden (Tabelle I).

Das Fermentpulver, falls im Exsikkator aufbewahrt, behielt seine Aktivität monatelang fast unverändert, aber in Lösung büsste das Ferment, selbst im Eisschrank, allmählich seine Wirkung ein und nach einer Woche war eine beträchtliche Abschwächung bemerkbar (Tabelle I).

Die optimale Azidität ist nach meisten Autoren bei P_H 6.5–7.5. Nach Levene, Rolf und Simms (1924) bleibt das Kobragift im P_H-Bereich von 6.5–7.5 aktiv, jedoch büsst es seine gesamte Aktivität bei P_H 8.0 ein. Für das Ferment des Pankreas haben Belfanti und Arnaudi (1932) auch P_H-Optimum bei 6.8–7 beobachtet. Hughes (1935) untersuchte mittels physiko-chemischer Methode die Geschwindigkeit der Hydrolyse des monomolekulären

Films von Lezithin zu Lysolezithin durch Schlangengifte und fand das PH-Optimum bei PH 7.3. Aber in vorliegendem Versuch fand die maximale Hydrolyse nach 1 stündiger Fermentwirkung bei PH 9.4 statt, und bei steigender Azidität nahm die Lysolezithinbildung allmählich ab, dagegen schnell bei abfallender Azidität (Tabelle II). Bei den Hämolyseversuchen wurde die Hydrolysemischung selbstverständlich vorher isotonisch neutralisiert. Ich habe die PH-Abhängigkeit der Lezithase mittels des hämolytischen Vermögens beurteilt, aber wenn man voraussetzt, dass das einmal gebildete Lysolezithin in irgendeiner Azidität weiter schnell zersetzbar ist, so wird das so ermittelte Optimum nicht immer richtig sein. Darum wurde ein möglicher Lysolezithinabbau in verschiedener Azidität untersucht. Das hierbei gebrauchte Lysolezithin wurde durch Hydrolyse des Lezithins mit demselben Ferment bereitet und selbst seine 0.002%ige Lösung vermochte in wiederholten Versuchen gleiches Volumen 2%iger Ziegenerythrocytenaufschwemmung sofort oder spätestens binnen 30 Sekunden völlig zu hämolysieren. Wie aus der Tabelle III ersichtlich, behielt eine verdünnte Lysolezithinlösung nach 6 und 9 stündiger Fermentwirkung noch in allen Fällen das hämolytische Vermögen, und selbst nach 21 stündiger Fermentwirkung blieb es bei PH$<$7.4 unverändert, aber bei PH 9.6 und 8.1 war eine starke Inaktivierung bemerkbar. Aus diesem Resultat kann man die Lage von dem Optimum der Lysolezithinbildung als PH 9.4 aussprechen.

Die Frage ist nun, ob die Lezithase als die Muttersubstanz des Lysolezithins auswählend α- oder β-Lezithin bevorzugt, und ob ein hämolytisch wirksames Produkt auch aus Kephalin durch Pankreaslezithase geliefert werden könnte. Bei dem Versuch mit α- oder β-Lezithin wurde aber kein Unterschied gefunden. Über das Lysokephalin hat Levene (1924) zuerst untersucht. Er konnte das Cobralezithid aus Eigelb in Lysolezithin und Lysokephalin fraktionieren. Dieses Lysokephalin zeigte hämolytische Wirkung aber dreimal schwächer als die des Lysolezithins. Magistris (1929) hat dagegen ein äusserst schwaches hämolytisches Vermögen des Lysokephalins gefunden, das auch einer Verunreinigung mit Lysolezithin zugeschrieben werden sollte.

Ich habe Kephalin aus Eigelb hergestellt. Es war cholinfrei. Die lösliche Pankreaslezithase bildete aus diesem Kephalin ein fast gleich hämolytisch wirksames Produkt wie aus dem Lezithin (Tabelle IV).

Da sowohl das Lezithin wie auch das Kephalin fermentativ in Lysokörper überführbar sind, ist das Vorhandensein der ungesättigten Fettsäure im Phosphatidmoleküle unbedingt nötig für das Entstehen der Lysokörper? Über diese Frage ist die Angabe von Contardi und Lätzer (1928) vorhanden, dass das von Grün und Limpächer (1926 u. 1927) synthetisch hergestellte Distearyl-Lezithin von Schlangengift nicht angegriffen wird. Ich habe das Hydrolezithin durch Hydrierung des Eigelblezithins mittels Palladiumschwarz hergestellt und die Pankreaslezithase darauf in gleicher Weise, wie oben erwähnt, einwirken lassen. Hierbei wurde auch eine hämolytische Substanz produziert, und bei P_H 7.0 viel leichter als aus dem Lezithin (Tabelle V), aber die maximale Hydrolyse fand nicht bei P_H 9.4, sondern bei 9.1 statt (Tabelle VI). Im Gegensatz zum Hydrolezithin vermochte das Bromlezithin keineswegs eine hämolytische Substanz zu liefern.

Der Einfluss der äusseren Bedingungen auf die Stabilität des Ferments wurde dann untersucht. Seine Hitzebeständigkeit ist ausserordentlich charakteristisch. Schon Flexner und Noguchi (1901) haben die hohe Thermostabilität des Kobragifts anerkannt, und auch Hughes (1935) beobachtete, dass die Schlangengifte bei P_H 5.9 andauerndes Kochen vertragen, während sie bei $P_H > 7$ durch Siedehitze rasch zerstört werden. Hinsichtlich der Pankreaslezithase liegt nach Belfanti und Arnaudi (1932) die Inaktivierungstemperatur für P_H-Bereich zwischen 5.7 und 7.6 bei 58–60°. Um die Stabilität in verschiedener Azidität zu untersuchen, habe ich die Fermentlösungen in verschiedener Azidität bei 60° 30 Minuten lang erwärmt, dann bei P_H 7.0 auf Lezithin einwirken lassen. Eine Aktivitätsabnahme war vorhanden, aber unter dieser Bedingung blieb der Einfluss der Azidität sehr gering und nur bei P_H 9 wurde eine weiter fortgeschrittene Inaktivierung beobachtet (Tabelle VII). Als dagegen die Fermentlösung bei 37° 18 Stunden stehen lassen wurde, war die P_H-Abhängigkeit der

Stabilität deutlich bemerkbar. Das Ferment war am stabilsten bei P_H 4.6, bei $P_H > 7.0$ wurde es unwirksam (Tabelle VIII). Daher kann man sagen, dass die Pankreaslezithase prinzipiell in gleicher Weise wie das Schlangenferment in schwach sauerer Reaktion beständiger ist als in alkalischer Reaktion. Bei vorigem Experiment hat man beobachtet, dass das Ferment bei weitem P_H-Bereich dem 30 minütigen Erhitzen auf 60° ziemlich gut widersteht. Der Temperatureinfluss wurde dann untersucht. Das in physiologischer Kochsalzlösung gelöste Ferment reagierte schwach sauer und P_H war 5. Hat man 0.5%ige Fermentlösung in physiologischer Kochsalzlösung auf 40, 50, 60, 80 oder 100° 30 Minuten lang erwärmt, und je auf Lezithin bei 37° einwirken lassen, so war es bei dem Hämolyseversuch bemerkbar, dass die Fermentaktivität wohl mit steigender Temperatur etwas abgeschwächt wurde, aber selbst 100° Erhitzen konnte das Ferment nicht total inaktivieren (Tabelle IX). Dabei wurde gleichzeitig erhoben, dass die Lipase, deren Existenz in dem Präparat durch Versuch mit Olivenöl und Tributyrin vorher bewiesen war, durch halbstündige Erhitzung auf 60° ihre Wirksamkeit vollkommen eingebüsst hat (Tabelle X). Darauf werde ich noch zurückkommen. Liess man diese bei 60° 30 Minuten lang erhitzte Fermentlösung in physiologischer Kochsalzlösung auf das Lezithin 1 Stunde einwirken, so fand die maximale Hydrolyse, nach isotonischer Neutralisation, mit Hilfe von Hämolyseversuch geprüft, auch bei P_H 9.4 statt, wie es mit dem nicht erhitzten Ferment der Fall war (Tabelle XI).

Wir können daher aussprechen, dass das P_H-Optimum der Lysolezithinbildung bei P_H 9.4 liegt. Das Ferment ist am stabilsten bei P_H 4.6, aber am wirksamsten, solange die Inaktivierung nicht stattfindet, bei P_H 9.4. Beide Optima stehen gerade beiderseits des Neutralpunkts. Bei langdauernden Versuchen wie bei der Darstellung des Lysolezithins kommt daher sicher die Inaktivierung des Ferments durch die alkalische Reaktion und damit eine geringere Ausbeute an Lyzokörper bei P_H 9.4 als bei neutraler Reaktion in Betracht.

Die Fermentlösung kann man dialysieren ohne Abschwächung im Vergleich mit der während derselben Zeitdauer stehen

gelassenen Lösung.

Ich möchte hier noch hinzufügen, dass die fermentative Lysolezithinbildung in keinem Fall von $CaCl_2$, KCN, NaF oder Urethan in $M/100$ Endkonzentration beeinflusst wird.

Wenn man dazu bemerkt, dass das Ferment in Wasser löslich ist und die Lösung sowohl Dialysieren wie auch kurzzeitiges Erhitzen verträgt, scheint eine solche Herstellung der Fermentlösung möglich, wie auch dass der Wasserextrakt des Pankreas kurz erhitzt, das Filtrat konzentriert und weiter nötigenfalls dialysiert werden könnte. Dies war aber nicht der Fall. Mit der grossen Menge Eiweisskoagula musste das Ferment inaktiviert und niedergeschlagen worden sein. Ich konnte andererseits beweisen, dass das Ferment bei Extrazusatz von Eieralbumin durch Erhitzen stark inaktiviert wird.

Es kommt nun die Frage, ob die Pankreaslezithase irgendeine Beziehung zu der Lipase habe. Wie schon oben angegeben, konnte ich beweisen, dass die Pankreaslezithase durch Erhitzen ohne beträchtlichen Verlust an ihrer Aktivität lipasefrei gemacht wird. Das bedeutet ohne weiteres, dass für die Lysolezithinbildung die Lipase im engeren Sinne nicht unbedingt Anteil zu nehmen braucht. Aber umgekehrt soll die Lipase selbst das Lezithin in Lysolezithin überzuführen im Stande sein? Ich habe Pankreaslipase nach dem Adsorptionsverfahren von Willstätter gereinigt und konnte beobachten, dass diese Fermentlösung aus dem Lezithin keine hämolytisch aktive Substanz zu liefern vermag. Contardi und Lätzer (1928) haben mitgeteilt, dass die Ricinuslipase das Lezithin unter manchen Versuchen nur in einem einzigen Fall in Lysokörper abbaute, während in allen übrigen Fällen die Bildung des hämolytisch aktiven Produkts niemals beobachtet werden konnte, weil der enzymatische Prozess weiter bis zur vollständigen Hydrolyse des Ausgangsprodukts gegangen sein sollte.

Ob die Lipase überhaupt das Lezithin abzubauen im Stande ist, muss also untersucht werden. Das Experiment verlief negativ. Die gereinigte Pankreaslipase verursachte keine freie Fettsäurebildung aus Lezithin, die alkalimetrisch zu beweisen wäre, und ausserdem konnte das reine Lysolezithin selbst in verdünnter

Lösung bei P_H 8.9 mit der Lipase ohne merklichen Verlust an seinem hämolytischen Vermögen 4 Stunden lang bei 37° aufbewahrt werden (Tabelle XII). Nach dem obigen Resultat können wir sagen, dass das lysolezithinliefernde Ferment ein spezifisches und einheitliches Ferment ist und von der Lipase scharf abgetrennt werden muss. Andererseits ist es klar von der Phosphatase verschieden, die das Phosphatid dephosphoriert. Daher möchte ich mit Udagawa (1935) vorschlagen, dass das Ferment, das im allgemeinen auf das Phosphatid in solcher Weise einwirkt, dass ein Molekül Fettsäure daraus abgespaltet wird, Phospholipase genannt werden soll. Die weitere Fettsäureabspaltung habe ich nicht untersucht. Wie oben erwähnt, habe ich nach lang dauernder Wirkung der Pankreaslezithase bei alkalischer Reaktion den Schwund von hämolytischem Vermögen des Lysolezithins beobachtet. Diese Inaktivierung mag mit der weiteren Abspaltung der Fettsäure zusammenhängen, aber sie soll nicht ohne weiteres solcher Hydrolyse zugeschrieben werden, weil das gebrauchte Fermentpräparat auch Phosphodiesterase enthielt und daher ein eventueller Abbau am Phosphorsäureesteranteil nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Phospholipaselösung löst ohne Lezithin Erythrocyten nicht auf. Es hängt teils mit der Schwerpermeabilität des Ferments durch das Zellmembran zusammen. Aber als ich das Ferment auf die isolierte Lezithinfraktion des Serums und der Erythrocyten von Ziege, Kaninchen und Meerschweinchen einwirken liess, wurde beobachtet, dass keine hämolytische Substanz aus der Lipoidfraktion des Ziegenblutes gebildet wurde, während dieselbe Fraktion von Meerschweinchen unter gleicher Bedingung einen Lysokörper lieferte, der besonders aktiv war gegen eigene Blutzellen (Tabelle XIII). Die Frage wie die Differenz zwischen den Lipoidfraktionen je nach verschiedenen Tierarten hinsichtlich der Lysolezithinbildung zustande kommt, ist zukünftiger Untersuchung vorbehalten.

Experimenteller Teil.

I. *Ferment.*

A. Pankreaslezithase: Frisches Pferdepankreas wurde zerhackt, gut gemahlen, und mit gleichem Gewicht Wasser über Nacht in den Eisschrank gestellt. Das klare Zentrifugat wurde mit $1\frac{1}{2}$ fachem Volumen 96% Alkohol vermischt. Den entstandenen Niederschlag wusch man zweimal mit absolutem Alkohol und trocknete darauf mit Äther. Das nun pulverige Ferment wurde in Wasser gelöst und nach Entfernung der unlöslichen Masse wurde die klare Lösung mit Alkohol gefällt, wie zuvor, und zu Pulver getrocknet. Das Verfahren wurde noch zweimal wiederholt. Das endlich erhaltene Pulver war in Wasser leicht löslich und reagierte schwach sauer. Die neutralisierte Lösung dieses Pulvers in physiologischer Kochsalzlösung diente zur Untersuchung. Zum Versuche auf die Haltbarkeit des Ferments habe ich 0.5%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung ohne vorheriger Neutralisation in den Eisschrank gestellt, und gleich vor der Anstellung des Versuchs wurde die Stammlösung verdünnt. Zur Prüfung der Hitzebeständigkeit erhitzte man die Fermentlösung in physiologischer Kochsalzlösung am Wasserbade von verschiedener Temperatur. Falls Niederschlag dabei entstanden war, wurde die überstehende Flüssigkeit als Ferment gebraucht.

B. Gereinigte Pankreaslipase: Sie wurde nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz (1922) aus Pferdepankreas durch Adsorptionsverfahren mit Tonerdesuspension Sorte B hergestellt. 0.5 ccm Lipaselösung bewirkte eine 7.2%ige Spaltung des vorhandenen Olivenöls gemäss der Versuchsanordnung von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen (1922).

II. *Die Substrate.*

Lezithin wurde nach Sueyoshi (1931) aus Eigelb dargestellt.

α- und β-Lezithin: Lezithin wurde in Cadmiumdoppelsalz überführt, mit warmem Aceton nach Suzuki und Yokoyama (1930) in α- und β-Verbindung fraktioniert und durch Zersetzung jedes Salzes mit alkoholischem Ammoniak wie üblich in freies

Lezithin zurückgeführt. Die frische neutralisierte Lezithinemulsion in physiologischer Kochsalzlösung diente zur Untersuchung. Hydrolezithin wurde nach Levene und West (1918) aus Lezithin dargestellt und aus Methyläthylketon umkrystallisiert, Schmelzpunkt 235°. Es ist in Wasser unlöslich, 0.1%ige Suspension in 10%igem Alkohol wurde so hergestellt, indem man 1.0%ige Lösung im warmen Alkohol mit 9 fachem Volumen warmen Wassers versetzte. Da die Suspension bei Abkühlen oder Salzzusatz zur Fällung neigt, musste sie möglich bald nach der Herstellung zum Versuch gebraucht werden. Bromlezithin wurde nach Levene (1926) aus Eigelblezithin dargestellt und sowohl die Aceton- wie die Alkohollösliche Fraktion wurde wie beim Versuch mit Hydrolezithin in Wasser suspendiert.

Lysolezithindarstellung war wie folgt. 3.0 g Eigelblezithin in 300 ccm $M/15$ Na_2HPO_4 wurde mit 1.5 g Ferment, 1.0 ccm Toluol und, um P_H des Gemisches zu 7.6 anzustellen, mit geringem Natron versetzt und bei 37° 40 Stunden aufbewahrt, weil das hämolytische Vermögen nach 40 Stunden nicht mehr anstieg, dann wurde die Hydrolysemischung nach Iwata (1931), der die Levenesche Methode verbessert hat, behandelt. Ausbeute des rohen Lysolezithins war 0.5 g. Aus Pyridin zweimal umkrystallisiert, bildete Lysolezithin Aggregate von feinen Nadeln. Kephalin wurde nach Fischer und Hecht (1934) aus Eigelb hergestellt, in seinem Salzsäurehydrolysat war kein Cholin nachweisbar. Cholinbestimmung nach Roman (1930). Blutlipoidfraktion, die aus Petrolätherlösung durch Aceton und Magnesiumchlorid fällbar ist, wurde nach Bloor (1929) aus Serum und gut gewaschenen Erythrocyten bereitet und die ätherische Lösung wurde abgedampft, und der Rückstand in physiologischer Kochsalzlösung von ursprünglichem Volumen des extrahierten Blutes emulsiert. Organischer P wurde in aliquotem Teil nach Fiske und Subbarow (1925) bestimmt und der Lipoidgehalt wurde als Lezithin in mg/*dl* ausgerechnet. Ob die Extraktion des Phospholipins dabei quantitativ vonstatten gegangen ist, möchte ich späterer Untersuchung vorbehalten.

	Ziege	Kaninchen	Meerschweinchen
Erythrocyten	59.5	115.6	70.5
Serum	140.0	101.5	24.0

III. Versuchsanordnung.

Die Pufferlösung war isotonische Veronal-Acetat-Salzsäure von Michaelis (1931) und $M/7$ Glykokoll-Natron, die aus $M/7$ Glykokoll in 0.425%iger Kochsalzlösung und $M/7$ Natron in 0.85%iger Kochsalzlösung besteht. P_H elektrometrisch. In den nachstehenden Tabellen wurde die Zusammensetzung des Versuchsansatzes einzeln angegeben. 2%ige Aufschwemmung der viermal gewaschenen Ziegenerythrocyten in physiologischer Kochsalzlösung wurde gebraucht, wenn sonst nichts Besonderes angegeben ist. Als die Hydrolyse in verschiedener Azidität untersucht wurde, stellte ich die Azidität der Hydrolysemischung bei Veronalpuffer durch Zusatz einer berechneten Menge von $M/10$ Salzsäure oder Natron in physiologischer Kochsalzlösung zu P_H 7.0 um; Glykokoll-Natronpuffer neutralisierte man mit der dem Natron äquivalenten Menge von $M/7$ Salzsäure. Die neutralisierten Lösungen wurden weiter mit Veronal-Acetat-Salzsäure von P_H 7.0 auf ein bestimmtes Volumen verdünnt. Hydrolyseversuch wurde bei 37° und, wenn sonst nichts angegeben, bei P_H 7.0 ausgeführt und das hämolytische Vermögen wurde bei Zimmertemperatur geprüft, indem die Hydrolysemischung mit gleichem Volumen 2% Erythrocytensuspension gemischt und die Zeit der totalen Hämolyse bemessen wurde. Bei einigen Versuchen habe ich den Grad der Hämolyse nach bestimmter Zeit bemessen. Das beobachtete Resultat wird in den Protokollen wie folgt angegeben: vollständige Hämolyse ⧺, starke ⧺, mittelstarke ⧺, schwache +, spurige ± und negative —.

Ergebnisse.

I. Aktivität des Ferments (Tabelle I).

1% Lezithin	0.5 ccm	P_H 7.0
Fermentlösung (1:500–1:12000)	1.0 „	
Pufferlösung	0.5 „	

Nach 1–3 stündiger Fermentwirkung wurde 1.0 ccm davon mit gleichem Volumen 2% Blutzellenaufschwemmung gemischt. Zeit der Totalhämolyse wurde bei Zimmertemperatur beobachtet.

Dieselbe Stammlösung des Ferments wurde im Eisschrank 7 Tage aufbewahrt, um ihre Haltbarkeit in gleicher Weise zu untersuchen.

Tabelle I.

	Endkonz. d. Ferm. / Hydrolysedauer	1/1000	1/3000	1/6000	1/12000	1/24000	ohne Ferment
frische Fermentlösung	1 Std.	1′	2′	60′	4°	20°	—
	3 Stdn.	1′	1′	3′	5′	60′	—
nach 7 Tage Aufbewahren	1 Std.	5′	2°	20°	—	—	—
	3 Stdn.	3′	4′	30′	20°	—	—

II. Lysolezithinbildung in verschiedener Azidität (Tabelle II).

2% Lezithin	0.5 ccm
Fermentlösung (1:100)	0.5 „
Pufferlösung	5.0 „

Die Hydrolysemischung wurde nach 1 stündiger Fermentwirkung isotonisch neutralisiert und mit Pufferlösung von P_H 7.0 auf 12.0 ccm aufgefüllt. Hämolyseversuch mit 1.0 ccm davon + 1.0 ccm 2% Blutzellensuspension.

Tabelle II.

P_H	11.5	10.1	9.7	9.4	8.9	8.4	8.2	7.0	6.8	6.2	4.9	3.6
Totalhämolyse nach	2°	55′	3′	1′	1′30″	3′30″	13′	30′	35′	60′	1°25′	2°26′

III. Inaktivierung des Lysolezithins bei Lezithasewirkung (Tabelle III).

0.05% Lysolezithinlösung in $M/7$ NaCl	1.5 ccm
Fermentlösung (1:100)	1.5 „
Pufferlösung	7.5 „

Nach 6–21 stündiger Fermentwirkung wurde davon 1.4 ccm abpipettiert, isotonisch neutralisiert und mit Pufferlösung von PH 7.0 auf 1.8 ccm aufgefüllt und dann mit gleichem Volumen 2% Blutzellensuspension gemischt. Der Grad der Hämolyse wurde nach 2 Minuten beobachtet.

TABELLE III.

PH. / Lezithasewirk.	9.6	8.2	7.4	6.1	4.9
6 Stdn.	+++	+++	+++	+++	+++
9 „	+++	+++	+++	+++	+++
21 „	—	±	+++	+++	+++

IV. Vergleichende Lysokörperbildung aus Eigelblezithin und Eigelbkephalin (Tabelle IV).

0.0125–0.1% Lezithin- oder Kaphalin in *M*/7 NaCl	0.5 ccm	PH 7.0
0.2% Fermentlösung	0.5 „	
2% Blutzellenaufschwemmung	1.0 „	

Das Gemisch wurde am Wasserbad von 37° erwärmt und die Zeit der Totalhämolyse wurde beobachtet.

TABELLE IV.

Endkonz. d. Substrate	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000
bei Kephalin	30′	40′	90′	+ nach 2 Stdn.
bei Lezithin	30′	40′	60′	+++ nach 2 Stdn.

V. Vergleichender Versuch der Lysolezithinbildung aus Hydrolezithin und Lezithin (Tabelle V).

0.1% Hydrolezithin- oder Lezithin-Suspension in 10% Alkohol	1.0 ccm	PH 7.0
Fermentlösung in destilliertem Wasser (1:150)	1.0 „	
Pufferlösung*	2.0 „	

* 5.0 ccm $M/7$ Veronal-Acetatlösung + 6.0 ccm $N/10$ HCl + 14.0 ccm Wasser. Zusatz von 2.0 ccm 8.5% NaCl nach Michaelis wurde in diesem Fall absichtlich weggelassen.

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde davon 0.9 ccm abpipettiert und mit 0.1 ccm 8.5% NaCl versetzt. Hämolyseversuch mit 1.0 ccm davon + 1.0 ccm 2% Blutzellenaufschwemmung.

Tabelle V.

Substrat	Lezithin	Hydrolezithin
Totalhämolyse nach	14′	4′

VI. Hydrolezithinspaltung bei verschiedener Azidität (Tabelle VI).

1% Hydrolezithin in 10% Alkohol	1.0 ccm
Fermentlösung in destilliertem Wasser (1:100)	1.0 „
Pufferlösung	2.5 „ „

Nach 3 stündiger Fermentwirkung wurde davon 0.9 ccm abpipettiert, nach isotonischer Neutralisation auf 3.0 ccm mit Pufferlösung von P_H 7.0 aufgefüllt und mit 3.0 ccm 2% Blutzellensuspension gemischt.

Tabelle VI.

Grad d. Hämolyse \ P_H	10.3	9.6	9.1	8.2	7.4	7.0	6.1	5.0	3.6
nach 30′	–	±	++	++	±	±	–	–	–
nach 60′	–	+	+++	++	+	±	±	±	–

VII. Stabilität der Lezithase in verschiedener Azidität bei 60° (Tabelle VII).

Fermentlösung (1:250)	0.5 ccm
Pufferlösung	0.5 „

Nach 30 minütigem Erhitzen wurde jede Probe neutralisiert und mit Puffer auf 2.0 ccm aufgefüllt. 1.25 ccm davon wurde auf 0.25 ccm 1% Lezithin 1 Stunde lang bei P_H 7.0 einwirken gelassen und dann mit 1.5 ccm 2% Blutzellensuspension gemischt.

Tabelle VII.

PH	5.6	6.0	7.0	8.4	9.0	ohne Erhitz.
nach 10′	+	+	+	+	+	++++
nach 30′	++++	++++	++++	++++	+++	

VIII. Stabilität der Phospholipase in verschiedener Azidität (Tabelle VIII).

Fermentlösung (1:200)	0.25 ccm
Pufferlösung von verschiedenem PH	0.50 „

Nach 18 stündigem Aufbewahren bei 37° wurde jede Probe isotonisch neutralisiert und mit isotonischem Michaelispuffer von PH 7.0 auf 1.75 ccm aufgefüllt. Die Lösung wurde je mit 0.25 ccm 1% Lezithin versetzt. Endkonzentration des Ferments war also 1:1600. Nach 1 stündiger Fermentwirkung bei 37° wurde zu der Hydrolysemischung 2 ccm 2% Erythrocyten zugesetzt. Frisch bereitete Fermentlösung war bei 1:1600 Endkonzentration so aktiv, dass totale Hämolyse in 4 Minuten beobachtet wurde.

Tabelle VIII.

PH	10.1	9.7	8.2	7.4	6.1	5.6	4.6	3.2
Totale Hämolyse nach	>24°	>24°	>24°	24°	22′	21′	15′	32′

IX. Stabilität der Fermentlösung bei verschiedener Temperatur (Tabelle IX).

Fermentlösung (1:200 und 1:400) wurde 30 Minuten bei unten angegebener Temperatur erhitzt und die folgenden Versuche wurden angestellt.

1.0% Lezithin	0.5 ccm
Fermentlösung	0.5 „
Puffer (PH 7.0)	2.0 „

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde jede Probe mit 2% Blutzellenaufschwemmung gemischt.

Tabelle IX.

Temperatur / Fermentlös.	Vor Erhitzung	40°	50°	60°	80°	100°
1:200	2′	3′	3′	6′	30′	2°
1:400	4′	12′	15′	20′	60′	/

X. *Lipasewirkung des aktiven Pulvers* (Tabelle X).

A. *Versuch mit Tributyrin.*

Gesättigte Tributyrinlösung im *M*/54 Phosphatgemisch von PH 7.6 — 10.0 ccm } bei 22°
Fermentlösung — 0.5 „ }

Stalagmometrische Bestimmung nach Rona und Michaelis (1911); Wasserwert der Tropfpipette=89 Tropfen.

Tabelle X A.

	Nicht erhitztes Ferment				Bei 60° 30 M. erhitzes Ferment
Konz. d. Ferm.	1:100	1:500	1:1000	ohne Ferm.	1:100
Sofort	119	119	119	119	119
Nach 30 Min.	99	110	110	119	119
Nach 60 Min.	93	104	105	119	119

B. *Versuch mit Olivenöl nach Willstätter,* Waldschmidt-Leitz und Memmen (1923).

Tabelle X B.

0.5 ccm Pankreaslipase	7.2% Hydrolyse
1.0 ccm 1% Pankreaslezithase	5.2% „
1.0 ccm bei 60° 30 Minuten erhitzte 1% Pankreaslezithase	Keine Hydrolyse

XI. Optimum-Bestimmung mit bei 60° 30 Minuten erhitzter Fermentlösung (Tabelle XI).

2% Lezithin	0.4 ccm
Fermentlösung (1:75)	1.6 „
Pufferlösung	5.0 „

Fermentwirkung bei 37° 1 Stunde. Nach isotonischer Neutralisation wurde jede Probe mit Pufferlösung von PH 7.0 auf 11.0 ccm aufgefüllt. Hämolyseversuch mit 1.0 ccm davon +1.0 ccm 2% Blutzellenaufschwemmung.

TABELLE XI.

PH	11.5	10.1	9.7	9.4	8.9	8.4	8.2	7.0	6.8	6.2	4.9	3.6
Totalhämolyse nach	25′	22′	6′10″	5′	6′	14′	23′	50′	70′	85′	120′	>2°

XII. Wirkung der Pankreaslipase und Pankreaslezithase auf Lysolezithin (Tabelle XII).

Lysolezithin (1:800)	2.0 ccm	PH 8.9
Pankreaslipase oder 1% Pankreaslezithase	0.5 „	
Pufferlösung	1.5 „	

Nach 1–4 stündigem Hydrolyseversuch wurde 0.5 ccm davon abpipettiert und nach isotonischer Neutralisation mit Pufferlösung von PH 7.0 auf 10.0 ccm aufgefüllt. Hämolyseversuch mit 1.0 ccm davon+1.0 ccm 2% Blutzellenaufschwemmung.

TABELLE XII.

Ferment / Dauer der Hydrolyse	Ohne Ferment	Lipase	Lezithase
Sofort	35″	35″	35″
Nach 1 Std.	40″	45″	40″
Nach 4 Stdn.	45″	3′	1′

XIII. Hydrolyse der Blutlipoidfraktion durch Pankreaslezithase (Tabelle XIII).

Lipoidfraktion	2.0 ccm	PH 7.0
Fermentlösung (1:300)	1.0 „	
Pufferlösung	1.0 „	

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde 1.0 ccm von jeder Probe mit 1.0 ccm 2% Ziegen- oder Eigenblutzellensuspension gemischt.

Tabelle XIII.

Tierarten	Ziege		Kaninchen		Meerschweinchen	
	Erythrocyten	Serum	Eryth.	Serum	Eryth.	Serum
Ziegenblutzellensusp.	—	—	2°	⧺ nach 4 Stdn.	1°30′	5°
Eigenblutzellensusp.	—	—	25′	⧺ nach 4 Stdn.	4′	3′

LITERATUR.

Belfanti, S. u. Arnaudi, C. (1932): Berichte über die gesamte Physiol., **76**, 737.

Bloor, W. R. (1929): J. of Biol. Chem., **82**, 273.

Contardi, A. u. Lätzer, P. (1928): Bioch. Z., **917**, 222.

Delezenne, C. u. Fourneau, E. (1914): Chem. Centralbl., 85–II, 52.

Fischer, A. u. Hecht, E. (1934): Biochem. Z., **269**, 120.

Flexner, S. and Noguchi, H. (1901): J. of Exp. Medicine, **6**, 277.

Grün, A. u. Limpächer, R. (1926, 1927): B. Chem. Ges., **59**, 1350; **60**, 147.

Hughes, A. (1935): Biochem. J., **29**, 437.

Iwata, M. (1931): Bulletin Agr. Chem. Soc. Japan, **7**, 577.

Levene, P. A. (1926): J. of Biol. Chem., **67**, 659.

Levene, P. A., Rolf, J. P. u. Simms, H. S. (1924): J. of Biol. Chem., **58**, 859.

Levene, P. A. u. West, C. J. (1918): J. of Chem., **33**, 111.

Magistris, H. (1929): Biochem. Z., **210**, 85.

Michaelis, L. (1931): Biochem. Z., **234**, 139.

Rona, P. u. Michaelis, L. (1911): Biochem. Z., **31**, 345.

Roman, W. (1930): Biochem. Z., **219**, 218.

Sueyoshi, Y. (1931): J. of Biochem., **13**, 143.

Suzuki, B. u. Yokoyama, Y. (1930): Proceed. Imp. Acad. Japan, **6**, 341.

Udagawa, H. (1935): J. of Biochem., **22**, 323.

Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leitz, E. (1923): Z. physiol. Chem., **125**, 132.

Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. u. Memmen, F. (1923): Z. physiol. Chem., **125**, 93.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

A CONTRIBUTION TO THE FAT METABOLISM.

The first report.

Experimental studies on the influence of high-fat diet upon the fat-carbohydrate metabolism.*

By

MASAKI MIYAZAKI.

(From the Medical Clinic of Prof. N. Kageura, Nagasaki Medical College, Japan.)

(Received for publication, September 23, 1936)

Since the discovery of insulin by Banting and his associates (1921) it has been frequently employed in the treatment of metabolic disturbance in general, especially in carbohydrate. But many experiences on diabetic patients have proved that the questions of the effect of the different constituents of the diet are of highest importance even when treating diabetes with insulin.

In 1922 Kageura has found by his careful investigations on dogs and non-diabetic persons that protein-fat diet causes a lowering of the faculty of the organism to assimilate carbohydrate—similar observations have been made by Staub (1922), Porges and Adlersberg (1926), Frank and Leiser (1929)—but it is recovered if carbohydrate is added to the same diet; in other words, either protein or fat, in the carbohydrate metabolism, is antagonized by carbohydrate. He has furthermore shown that there exists a definite ratio, in that case, between the amount of protein or fat on one side and the amount of carbohydrate on the other side. These findings were amply confirmed later by other investigators (Lee, Mori 1933, Matsuoka 1935). Especially Mori has shown by his detailed investigations that this Kageura's law can be applied also to mild cases of human diabetes. That is suitable to

* One part of this article was reported in the thirty-second annual meeting of the Japanese Society of Internal Medicine (held at Osaka, Japan, April 1–3, 1935).

throw light on the questions of dietary regulation of diabetes.

Since a long time ago it has been observed that diabetes, the essence of which is in the disturbance of the carbohydrate metabolism, is frequently associated with some abnormality of the fat metabolism, such as lipemia, acidosis etc. These clinical experiences lead us to suppose an intimate connection between carbohydrate and fat metabolism, and on this point many serious studies have been made by clinicians and also by biochemists. But the question remains still open. Here it seems to me that the protein-fat diet is a favorite subject for study in this field. So in a series of my present experiments I have supplemented Kageura's observations on carbohydrate metabolism by investigating the influence of protein-fat diet—especially carbohydrate-free high-fat diet—upon fat metabolism.

1. *The influence of high-fat diet upon the fat and glycogen content in the liver and its relation to preceding carbohydrate intake.*

For many investigators the content of fat and glycogen in the liver is a main theme in the studies of fat-carbohydrate metabolism and my attention was also concentrated on this theme from the first. In general, it is vaguely believed that the fat content of the liver is increased after a fat-rich food and the glycogen content of the organ is increased after a carbohydrate-rich food. On the other hand there exists a numerous literature on the quantitative relationship between fat and glycogen in the liver. According to Rosenfeld (1901) a reciprocal relationship exists between glycogen and fat in the liver; that means, when much glycogen is present, there is little or no fat, and vice versa. Certain liver poisons such as phloridzine (Rosenfeld 1895, Hayashi 1931, etc.), phosphorus (Rosenfeld 1903, Hayashi 1931, Andai 1933, Nagao and Ohtomo 1934, etc.), chloroform (Rosenfeld 1903, Hayashi 1932, Nagao 1934, etc.) etc. produce a fat liver in which the glycogen is strongly reduced or perfectly vanished. A similar phenomenon is observed also in the starvation (Reiss and Schwoch 1926, Hayashi 1931, etc.), anemia, cachexy etc. All

these observations are in agreement with Rosenfeld's theory. But there are other observations which do not correspond to his theory. The continuous administration of thyroid gland causes a parallel decrease of both fat and glycogen in the liver (Hayashi 1932). Similar observations have also been made by Tanaka (1932) and Matsuoka (1935). The continuous administration of interenin "Takeda" causes a parallel increase of both fat and glycogen in the liver (Matsuoka, 1935). Supposing from these results of other authors it seems that the quantitative relationship between fat and glycogen in the liver varies according to the conditions under which the experiments are performed. Hence the questions arise:

1) How is the fat and glycogen content in the liver influenced by a carbohydrate-free high-fat diet?

2) How is the fat and glycogen content in the liver influenced by adding relatively large quantities of carbohydrate to the same high-fat diet? To make these points clear the following experiments have been undertaken.

Experimental methods.

As experimental animals, full-grown, healthy dogs were employed and three groups of them were fed for five days with the diets of following composition.

Diet NM (normal mixed diet): beef 7.5 g, lard 1.0 g, boiled rice 35 g, per kilo, per day.

Diet HF (high-fat diet): beef 7.5 g, lard 6.0 g, per kilo, per day.

Diet HFC (high-fat diet plus carbohydrate): beef 7.5 g, lard 6.0 g, boiled rice 30 g, per kilo, per day.

The diets were given once a day in the morning and the animals usually ate them up in a few minutes. Vomiting and diarrhoea were not observed. Group A was fed with Diet NM in which the largest part of the total calories is given by the carbohydrate. Group B was fed with Diet HF in which carbohydrate is practically absent and the largest part of the total calories is given by the fat. Group C was fed with Diet HFC in which relatively large quantities of carbohydrate are added to the Diet HF without reducing

the amount of fat. The dogs of the group A and B showed no remarkable variation of their body weight. The dogs of the group C, the diet of which is naturally hypercaloric, showed a more or less marked increase of their body weight. After fasting about 24 hours the dogs were killed by air-embolism, their livers were searched for the fat and glycogen content. The glycogen was determined by means of the Mohri-Iwasaki method. The fat (total fat) was determined as follows. 10 g liver gruel was well mixed with absolute alcohol and filtrated (alcohol extract). The residue was dried, well powdered and extracted with pure ether, employing the Soxleht apparatus (ether extract). The alcohol extarct was extracted again with alcohol-ether mixture (3:1). The alcohol-ether extract was added to the ether extract and finally extracted again with pure ether. The ether extract thus obtained was dried in an evacuated desiccator for weighing.

Results.

The results are shown in Table I. A glance at this table will show that the amount of liver glycogen is roughly inversely proportional to the amount of the liver fat. The detailed analysis of the table is as follows. The glycogen content of the liver is the largest in the group A. This can be understood by the fact that the largest part of the diet was supplied by the carbohydrate. The fat content of the liver is the smallest in the same group. This can be understood by the fact that the fat amount of the diet was minimal. But it is of great interest to compare the group B with group C. The fat content of the liver is much larger in the group B than in the group C although the fat amount of their diet was nearly the same. On the contrary, the glycogen content of the organ is much larger in the group C than in the group B. Judging from these results it is highly probable that a preceding high-fat diet causes a fat increase and consequently glycogen decrease in the liver, but these effects of high-fat diet upon the liver can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same high-fat diet.

TABLE I.

Date	No. Sex	Body weight (kg.)	Diet (Group)	Liver		
				Weight (g.)	Glycogen (%)	Fat (%)
9/IX	1 ♂	6.9	NM(A)	272	3.41	2.34
12/ „	2 ♂	5.7	„	181	3.46	2.43
13/ „	3 ♀	7.9	„	285	5.05	2.51
„	4 ♂	5.5	„	170	2.28	2.12
„	5 ♂	7.5	„	195	3.83	2.23
			(average)		3.61	2.33
27/IX	6 ♂	6.1	HF(B)	240	0.46	3.45
25/X	8 ♂	6.4	„	171	0.65	3.96
29/ „	10 ♂	7.5	„	291	0.95	3.13
31/ „	12 ♀	5.8	„	170	0.55	5.34
5/XI	14 ♂	5.7	„	164	0.86	3.57
11/ „	17 ♂	4.5	„	156	0.77	3.60
15/ „	18 ♀	5.0	„	158	1.13	3.33
20/ „	20 ♀	5.8	„	229	0.61	4.28
			(average)		0.75	3.83
30/IX	7 ♂	7.0	HFC(C)	245	3.98	2.23
25/X	9 ♀	6.9	„	240	3.85	2.13
29/ „	11 ♀	7.5	„	285	2.87	2.94
31/ „	13 ♂	5.4	„	159	1.36	2.33
5/XI	15 ♂	5.4	„	247	2.28	2.62
8/ „	16 ♂	4.7	„	134	3.46	2.79
15/ „	19 ♀	6.9	„	284	3.88	2.11
20/ „	21 ♀	4.7	„	216	1.83	2.34
			(average)		2.81	2.44

2. *The influence of high-fat diet upon the glycogenetic function of the liver and its relation to the carbohydrate intake.*

According to Kageura (1924) the glycogenetic function of the liver is considerably lowered by protein-fat diet. On the other hand, it is stated that the glycogenetic function of the liver is much

lowered in the fat-rich, glycogen-poor liver (Porges and Adlersberg). If this is the case, the results of the preliminary experiments seem to suggest that the glycogenetic function lowered by protein-fat diet will be hightened by addition of carbohydrate to the same diet. In order to obtain the experimental evidence, the glycogenetic function of the liver was investigated on group B_1 and C_1 under the same dietetic conditions as in the preliminary experiments. The fat content of the liver was also determined in each case.

Methods.

The group B_1 was fed with Diet HF for five days. The group C_1 was fed for the same five days with Diet HFC. After about 24 hours fasting the dogs were killed by bleeding and the glycogenetic function was investigated on their isolated livers. For this purpose the liver, one lobe of which was cut off for the control determination of the glycogen and fat, was perfused for an hour with defibrinated blood to which the same quantity of Barrenscheen solution was added, employing the Yamakawa-Mizuki apparatus. The detail of this technic is described in the fourth report of Kageura (1924). The amount of the newly-formed glycogen is easily calculated from the value before and after the perfusion.

Results.

The results are shown in Table II. The relation of the content of the fat and glycogen in the liver to the diets is nearly the same as in the preliminary experiments; that is, the glycogen content of the liver is much larger in the group C_1 than in the group B_1; concerning the fat content of the liver the result is vice versa. The amount of the newly-formed glycogen is far larger in the group C_1 than in the group B_1, in other words, the glycogenetic function of the liver is much stronger in the group C_1 than in the group B_1. From these results it is highly probable that high-fat diet causes fat deposition and glycogen decrease in the liver, which are followed by the lowering of the glycogenetic function of the organ, but these

effects of high-fat diet upon the liver can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same diet.

TABLE II.

Date	No. Sex	Body weight (kg.)	Diet (Group)	Liver weight (g.)		Fat (%)	Glycogen			
							%	(g.)	Increase (g.)	Increase (g.) in 100g. Liver
10/XII	23 ♂	8.0	HF (B_1)	Before	209	4.15	0.63	1.32		
				After	261		0.67	1.75	0.43	0.21
17/ „	24 ♂	12.3	„	„	342	3.28	0.48	1.64		
				„	622		0.52	3.23	1.59	0.46
24/ „	25 ♀	5.7	„	„	192	5.51	0.52	1.00		
				„	289		0.43	1.24	0.24	0.13
24/ „	27 ♂	8.9	„	„	293	3.48	0.52	1.52		
				„	506		0.50	2.53	1.01	0.34
4/II	30 ♂	6.2	„	„	151	3.50	0.83	1.25		
				„	220		0.77	1.67	0.42	0.28
			(average)			3.98	0.60			0.32
6/XII	22 ♂	8.6	HFC (C_1)	Before	253	2.98	1.93	4.88		
				After	375		2.13	7.99	3.11	1.23
27/ „	26 ♂	8.3	„	„	269	2.59	2.14	5.81		
				„	365		2.24	8.18	2.37	0.84
14/I	28 ♀	11.5	„	„	382	3.01	1.31	5.00		
				„	525		1.52	7.98	2.98	0.78
17/„	29 ♂	14.5	„	„	423	2.69	1.29	5.46		
				„	572		1.45	8.29	2.83	0.67
7/II	31 ♂	6.0	„	„	184	2.79	3.12	6.02		
				„	284		2.87	8.15	2.13	1.16
			(average)			2.81	1.96			0.94

3. *The influence of the diets upon the fat content in the blood.*

It is stated that the fat content of the blood stands in close relation to the glycogen content in the liver; that means, when the

amount of the glycogen in the liver undergoes a decrease—as in grave diabetes, hunger, inanition etc.—the fat content of the blood is found to be increased (Thannhauser, Fürth etc.). From this statement it was supposed that the fat content in the blood might be influenced by the diets. Based upon this supposition the fat content of the blood was investigated under the same dietetic conditions as in the preliminary experiments. Four dogs were fed at first with Diet NM, then with Diet HF and finally with Diet HFC. Each diet was continued for five days and about 24 hours after the last meal in each feeding period about 3 ccm of the blood was drawn out from their cervical veins to estimate the fat content according to the Bloor method.

Results.

The results are shown in Table III. I will not add many words to this table. We see immediately that after 24 hours fasting the value for the blood fat shows no considerable difference in each feeding period.

Table III.

Diet / No. Sex.	NM (mg%)	HF (mg%)	HFC (mg%)
32 ♂	566	583	614
33 ♂	598	648	622
34 ♀	614	606	591
35 ♂	598	583	630
(average)	594	605	610

4. *The influence of the diets upon the alimentary lipemia.*

With regard to the fat content in the blood the question which at once arises is that of alimentary lipemia. If the fat is administered together with carbohydrate, according to Bang (1918), the alimentary lipemia could be hindered, because the liver rich in glycogen catches the fat from the blood so rapidly that an increase of the blood fat does not occur. Considering from his statement it

seems to be of interest to compare the degree of the alimentary lipemia in the same dietetic conditions as in the preliminary experiments. So on four dogs, which were fed as in the previous experiments, the alimentary lipemia was investigated. For this purpose olive oil (10 ccm per kilo) was administered by stomach-sound about 24 hours after the last meal in each feeding period and the blood was drawn out at 2 hours interval for six hours. Vomiting and diarrhoea were not observed.

Results.

The results are shown in Table IV. With the exception of dog No. 33, in all the cases the blood fat is found to be slightly increased—generally speaking the maximal point is in the fourth hour—after the administration of olive oil, but no marked difference can be recognized in each feeding period. Dog No. 33, whose fasting value for the blood fat is distinctly highered in the case of high-fat diet, shows a considerable increase of the blood fat after olive oil intake in the same case. Although this result is not suitable to draw a conclusion, it is by no means negligible.

Table IV.

No. Sex	Time / Diet	Before (mg%)	2h. (mg%)	4h. (mg%)	6h. (mg%)	Absolute increase (%)
32 ♂	NM	648	791	729	676	143
	HF	622	630	741	630	119
	HFC	614	753	718	741	139
33 ♂	NM	530	546	614	648	118
	HF	900	933	1166	1057	266
	HFC	583	614	648	598	155
34 ♀	NM	606	725	676	650	119
	HF	583	600	686	648	103
	HFC	614	718	648	630	104
35 ♂	NM	569	729	741	614	160
	HF	598	741	777	630	179
	HFC	606	630	741	622	135

5. *The influence of fat intake upon the content of fat and glycogen in the liver, and its relation to preceding diets.*

Pryde has stated that during adsorption, in addition to increasing in the blood, the fat is also found to accumulate in the liver. A few researches which suggest the possibility of such phenomenon have been made (Joannovovics and Pick 1910, Schur, Artur and Anton 1934, etc.), but its relation to the preceding diets has never been investigated. Hence on two groups of dogs (A_2 and B_2) the following experiments were undertaken. Group A_2 was fed for five days with Diet NM. Group B_2 was fed for the same five days with Diet HF. About 24 hours after the last meal olive oil (10 ccm per kilo) was administered by stomach-sound and six hours later the animals were killed by air-embolism to determine the fat content of the liver. The glycogen content was also determined in each case. The inspection of the gastro-intestinal content proved no marked difference in both groups, although generally a small amount of the olive oil remained still unadsorbed.

Results.

The results are shown in Table V and for convenience they are compared with those of the preliminary experiments in Table VI. From Table VI we see that the fat content of the liver is larger in the group A_2 and B_2 than in the corresponding group A and B in the preliminary experiments. Here I will specially point out the great difference between the group B and B_2. The glycogen content of the liver of the group A_2 and B_2 is not larger than that of the corresponding group A and B in the preliminary experiments. This result indicates that fat intake does not increase the glycogen content of the liver.

According to Bang's opinion, as before mentioned, the imported fat is more rapidly caught by the liver rich in glycogen than by that poor in glycogen. My results above obtained, however, are completely against this opinion. Therefore, if the

alimentary lipemia is hindered by the simultaneous intake of carbohydrate—it seems to me very interesting—as he claims, another explanation must be offered. Now returning to my main theme to conclude what is known by these experimental results, I may say that the fat administered per os is accumulated in the liver much more in the case of preceding high-fat diet than in that of preceding normal mixed diet. But here the difficult question arises whether the glycogen amount of the liver is an important factor decisive for the fat accumulating power of the liver, or not. It is at present impossible to answer, but I am inclined to the belief that this increasing of the fat accumulating power of the liver is at least partly due to the changed function of the organ, which is caused by the one-sided nutrition.

These findings just discussed are of great interest in comparison with Fischler's opinion which is shown in the following quotation from "Physiologie und Pathologie der Leber". "Die Leber hat unter gewöhnlichen Resorptionsverhältnissen nicht ausschlaggebend mit der direkten Aufnahme von Fett zu tun. Denn es gelingt, Tiere in ihren Fettdepots mit körperfremdem Fette anzureichern, ohne dass dieses Fett in der Leber nachzuweisen ist. Das Fett umgeht die Leber zum grössten Teile bei der Resorption auf dem Wege der Chyluslymphbahnen, einige Chylusgefässe ziehen allerdings auch zur Leber. Ob besondere Fettarten, wie ungesättigte Fette oder Lipoide in der Leber nach ihrer Darmresorption regelmässig deponiert werden, ist noch nicht zu entscheiden. Die Mastfettleber stellt eine auf der Grenze zwischen physiologischem und pathologischem Zustande stehende Erscheinung dar".

6. The influence of the simultaneous intake of fat and carbohydrate upon the content of fat and glycogen in the liver, and its relation to preceding diets.

In the preliminary experiments it was demonstrated that the fat deposition in the liver, which is caused by high-fat diet, is prevented by the addition of carbohydrate to the same diet. To obtain further evidence additional experiments were performed on

Table V.

Date	No. Sex	Body weight (kg.)	Diet (Group)	Liver		
				Weight (g.)	Glycogen (%)	Fat (%)
30/VII	33 ♂	6.3	HF (B_2)	220	0.48	8.44
„	34 ♀	6.2	„	201	0.81	−4.39
„	35 ♂	6.7	„	172	0.68	5.69
			(average)		0.66	6.17
5/XII	36 ♂	5.9	NM (A_2)	227	3.30	3.25
„	37 ♂	5.2	„	253	3.15	2.89
12/XII	38 ♀	4.8	„	165	1.63	3.24
			(average)		2.67	3.13

Table VI.

Liver / Administ. substance / Diet	Glycogen (%)		Fat (%)	
	HF (Group)	NM (Group)	HF (Group)	NM (Group)
(−)	0.75 (B)	3.61 (A)	3.83 (B)	2.33 (A)
Olive oil	0.66 (B_2)	2.67 (A_2)	6.17 (B_2)	3.13 (A_2)
(difference)	−0.09	−0.94	+2.34	+0.80

two groups of dogs (A_3 and B_3). Group A_3 was fed with Diet NM for five days. Group B_3 was fed with Diet HF for the same five days. About 24 hours after the last meal, olive oil (10 ccm per kilo) was administered together with glucose (20%, 25 ccm per kilo) by stomach-sound and six hours later the animals were killed by air-embolism to determine the fat content in the liver. The glycogen content was also determined in each case.

Results.

The results are shown in Table VII and for convenience they are compared with those of the previous experiments in Table VIII. The fat content of the liver is smaller in the group A_3 and B_3 than in the corresponding group A_2 and B_2 in the previous experiments.

This result lends striking support to the conclusion obtained from the preliminary experiments, that the fat deposition in the liver, which is caused by fat intake, can be prevented by the simultaneous intake of carbohydrate. The marked difference of the fat content in the liver between the group B_2 and B_3 will be explained by the fact that the amount of fat, which is accumulated in the liver by fat intake, is far larger in the case of preceding high-fat diet than in that of preceding normal mixed diet. The glycogen content of the liver is higher in the group A_3 and B_3 than in the corresponding group A_2 and B_2 in the previous experiments. But here the difference between the group B_2 and B_3 is very small. This result indicates that the glycogenetic function of the liver is distinctly lowered by high-fat diet. It is in agreement with the result of earlier experiments by Kageura (1924).

TABLE VII.

Date	No. Sex	Body weight (kg.)	Diet (Group)	Liver		
				Weight (g.)	Glycogen (%)	Fat (%)
11/IX	39 ♂	5.4	HF (B_3)	165	1.32	3.93
18/„	41 ♂	5.5	„	205	1.11	3.61
22/„	43 ♀	4.3	„	146	2.24	4.14
			(average)		1.59	3.89
11/IX	40 ♂	4.5	NM (A_3)	185	3·04	2.31
18/„	42 ♀	4.2	„	168	4 89	2.71
22/„	44 ♂	5.9	„	212	4.93	2.97
			(average)		4.27	2.66

TABLE VIII.

Liver / Administ. substance / Diet	Glycogen (%)		Fat (%)	
	HF (Group)	NM (Group)	HF (Group)	NM (Group)
Olive oil	0.66 (B_2)	2.67 (A_2)	6.17 (B_2)	3.13 (A_2)
Olive oil + Glucose	1.59 (B_3)	4.27 (A_3)	3.89 (B_3)	2.66 (A_3)
(difference)	+0.93	+1.60	−2.28	−0.47

General discussion.

The results obtained from a series of my present experiments are not only interesting from the point of view of the pathological physiology of the liver but important from the standpoint of the dietetic treatment of diabetes. Today high-fat diet is frequently employed in the dietary management of diabetes and in that case special attention is paid to the dreaded acidosis. However, apart from the question of the acidosis, a few authors have lately expressed the opinion that high-fat diet causes a lowering of the assimilative ability for carbohydrate. Porges and Adlersberg have specially emphasized, in their monograph "Die Behandlung der Zuckerkrankheit mit fettarmer Kost", the harmful effect of high-fat diet and laid the weight of its harmful effect upon the fat deposition and glycogen decrease in the liver. From Kageura's study already mentioned there is no doubt that high-fat diet lowers the carbohydrate assimilating faculty of the organism. But, as he clearly demonstrated, this harmful action of high-fat diet can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same high-fat diet. Considering from this fact it seems to me that their theory on the dietary treatment of diabetes must be altered to a certain extent. Indeed, as my experimental results indicate, high-fat diet causes a fat deposition and consequently glycogen decrease in the liver, and under these conditions its glycogenetic function is found to be distinctly lowered—on this point I entirely follow them—but this harmful effect can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same high-fat diet. Hence it should be strongly emphasized that, when a larger amount of carbohydrate is given—of course under consideration of the carbohydrate assimilating ability at the time—a larger amount of fat may be given without harmful effect on the sugar assimilation. We believe that this finding has an important significance in the treatment of most cases of diabetes.

According to Murata (1936) such antagonistical relationship between fat and carbohydrate exists also in the side of blood lipoid. He has succesfully demonstrated by his recent investigation on non-diabetic and mild diabetic patients that the lipoid content in

the blood shows a higher value by high-fat diet, which returns to the normal level by the addition of the adequate quantities of carbohydrate. My experiments on dogs failed in the majority of the cases to show such a relation. This negative result seems to support the idea of Bloor who stated that the production of lipemia is difficult in a normal dog.

Summary.

From the experiments on dogs the following results were obtained.

1. High-fat diet continued for several days causes a fat deposition and glycogen decrease in the liver, but this effect of high-fat diet can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same high-fat diet.

2. High-fat diet continued for several days causes a lowering of the glycogenetic function of the liver, but this effect of high-fat diet can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same high-fat diet.

3. High-fat diet has no special influence upon the fasting level of the blood fat.

4. Preceding high-fat diet has no special influence upon the alimentary lipemia.

5. The fat accumulating power of the liver is increased by preceding high-fat diet, but it can be paralysed by the simultaneous intake of carbohydrate.

I wish to express my gratitude to Prof. N. Kageura for suggesting this study and his guidance throughout the course of my research. My thanks are due to Dr. Y. Sendju also for his help and advice.

REFERENCES.

Andai, G. (1934): Cited after Kongresszentralbl. f. d. ges. inn. Med., **75**, 724.

Bang, I. (1918): Biochem. Zeitschr., **91**, 111.

Banting, F. G. (1921): Cited after Lichtwitz's Klinische Chemie, **2**, 251.

Bloor, W. R. (1914): Journ. of Biol. Chem., **17**, 377.

Bloor, W. R. (1924): Cited after Joslin's Treatment of Diabetes Mellitus, Third Edition, 191.
Fischler, F. (1925): Physiologie und Pathologie der Leber, **2**, 106.
Frank, E. and Leiser, R. (1929): Med. Klinik, **25**, 1841.
Fürth, O. (1928): Lehrbuch der Physiologischen und Pathologischen Chemie, **2**, 350.
Hayashi, T. (1931): Journ. of Gastroenterology, **6**, 592 and 607.
Hayashi, T. (1932): Journ. of Gastroenterology, **7**, 69.
Joannovovices, G. and Pick, E. P. (1910): Cited after Fischler's Physiol. u. Pathol. d. Leber, **2**, 86.
Kageura, N. (1922): Journ. of Biochem., **1**, 333 and 389; **2**, 341.
Kageura, N. (1924): Journ. of Biochem., **3**, 205 and 457.
Lee, T. (1933): Tokyo Igakkwai Zasshi, **47**, 1961.
Matsuoka, M. (1935): Journ. of Biochem., **23**, 161.
Matsuoka, Y. (1935): Journ. of Gastroenterology, **10**, 891 and 906.
Mori, S. (1933): Tokyo Igakkwai Zasshi, **47**, 1805.
Murata, Y. (1936): Tokyo Igakkwai Zasshi, **50**, 383.
Nagao, S. and Ohtomo, Y. (1934): Nippon Naikagakkwai Zasshi, **22**, 1116.
Nagao, S. (1934): Grenzgebiet, **8**, 217.
Porges, O. and Adlersberg, D. (1926): Klin. Wochenschr., **5**, 1451.
Porges, O. and Adlersberg, D. (1929): Die Behandlung der Zuckerkrankheit mit fettarmer Kost.
Pryde, J. (1931): Recent Advances in Biochemistry, Third Edition, 160.
Reiss, M. and Schwoch, G. (1926): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., **49**, 270.
Rosenfeld, G. (1895): Zeitschr. f. Kl. Med., **28**, 256.
Rosenfeld, G. (1901): Verhandl. d. Kongr. f. inn. Med., **19**, 518.
Rosenfeld, G. (1903): Ergebn. d. Physiol., **2**, 50.
Staub, H. (1922): Zeitschr. f. klin. Med., **93**, 123.
Tanaka, T. (1932): Mitteil. d. med. Gesellsch. zu Osaka, **31**, 3811.
Tannhauser (1924): Stoffwechsel und Stoffwechselkrankheiten, 307.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

GEWEBSOXYDATION DER NUCLEINSÄURE.

IV. Mitteilung:

Über die Mitwirkung des Co-Fermentes auf Dehydrierung durch Gegenwart von Nucleinsäuredehydrogenase.

Von

YUKIO TSUGE.

Aus der medizinischen Klinik des Dairen Hospitals in Dairen, Südmanschurei (Direktor: Prof. Dr. K. Morinaka.)

(Eingegangen am 29. September 1936.)

Wir fanden in der vorliegenden Arbeit, dass die Hefenucleinsäure in cytolysierten roten Blutzellen durch Dehydrogenase oxydiert wird, wenn Methylenblau als Wasserstoffacceptor zur Verfügung steht.

Bekanntlich liegt in der von Warbung und Christian untersuchten Gewebsatmung ein Aktivator vor, der aus Pferdeblutzellen gewonnen wird und von O. Warburg als Atmungs-Co-Ferment bezeichnet wird. Für die Notwendigkeit des Co-Ferment als Aktivator bei den Dehydrasesystemen liegt eine grosse Anzahl von beweisenden Untersuchungen vor. Dagegen ist die Frage über den Wirkungsmechanismus des Co-Fermentes noch unklar.

Wie Tab. I und II zeigt, lässt sich tatsächlich auch die Wirkung der Nucleinsäuredehydrogenase durch Zusatz von Co-Ferment steigern. Bei allen in diesen Mitteilungen beschriebenen Dehydrierungsreaktionen ist als notwendiger Aktivator das Co-Ferment der Dehydrierungssysteme der Nucleinsäure in Form der cytolysierten roten Blutzellen des Menschen verwendet werden.

Vorläufig lässt sich die Exsistenz der Nucleinsäuredehydrogenase nur an Hefenucleinsäure demonstrieren. Im folgenden wurde der Dehydrierungsversuch mit der Thymonucleinsäure nochmal unternommen.

Versuch I.

Dehydrierung der Thymonucleinsäure durch Methylenblau und Dehydrogenase aus der Darmmucosa.

Die Versuche wurden nach der bekannten Thunberg-Ahlgren-Methode durchgeführt.

Fermentlösung: Darstellung aus der Mucosa des Kaninchendünndarms durch 10%ige Extraktion mit Phosphatpuffer P_H 7,1.

Darstellung des Co-Fermentes: Die roten Blutzellen von 5,0 ccm Blut vom gesundem Menschen, durch Schütteln defibriniert, werden in 0,9%iger Kochsalzlösung mehrmals auf Zentrifuge gewaschen, scharf zentrifugiert und das Zellsediment cytolysiert, indem man mit H_2O auf das ursprüngliche Blutvolumen auffüllt. Dann wurden die Stroma wieder durch Zentrifugieren mit Phosphatlösung P_H 7,1 entfernt. Die klare hellrote, stromafreie Flüssigkeit wurde in bestimmter Menge in eine Thunbergsche Vakuumröhre abpipettiert.

Methylenblau von Merck: 1:10000; 0,4 ccm pro Ansatz.

Tabelle I.

Vakuumrohr Nr.	Ferment-Lösung ccm	0,3% Thymonucleinsaures Natrium ccm	Mb-Lösung ccm	Co-Ferment ccm	H_2O ccm	Entfärbungszeit in Min.
1	1	1	0,4	—	—	48
2	1	1	0,4	—	—	46
3	1	1	0,4	—	—	42
4	1	1	0,4	—	—	45
5	1	1	0,4	—	—	44
6	1	—	0,4	—	1,0	∞
7	1	1	0,4	0,2	—	38
8	1	1	0,4	0,2	—	36
9	1	1	0,4	0,2	—	38
10	1	1	0,4	0,2	—	37
11	1	1	0,4	0,2	—	35
12	1	—	0,4	0,2	1,0	∞
13	—	1	0,4	0,2	1,0	∞
14	—	1	0,3	1,3	—	∞

∞ zeigt Kontrolle, nach 3 Stunden keine Entfärbung.

Substrat: Thymonucleinsäure von Kahlbaum, die wir ebenfalls in Form des Natriumsalzes verwandten, benutzten wir in 0,3%iger Lösung. Versuchstemperatur 37°.

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, dass Thymonucleinsäure in der Fermentlösung durch Dehydrogenase aus der Darmmucosa schnell oxydiert wird. Die Entfärbungszeiten im Versuch Nr. 1–5 ohne Zusatz von Co-Ferment sind 42–48 Minuten. Ein Zusatz von Co-Ferment (Nr. 7–11) senkt die Entfärbungszeit um 36 Minuten, während die Kontrolle mit H_2O, ohne Dehydrogenase, ohne Donator nach 3 Stunden nicht entfärbt. Die Mengen des Co-Fermentes, die zur maximalen Aktivierung nötig sind, und die Abhängigkeit der Entfärbungszeiten von Co-Ferment-Zusatz sind aus Tab. II ersichtlich.

Versuch II.

Vergleich der Entfärbungszeit bei Zugabe des Co-Fermentes auf Dehydrierung der Hefenucleinsäure und Thymonucleinsäure.

Reaktionsgemisch I: 1,0 ccm 318 mg hefenucleinsaures Natrium von Merck (Gef. N 16,41 nach Kjeldahl) mit destilliertem H_2O auf 100,0 ccm aufgefüllt; 1,0 ccm Fermentlösung; 0,4 ccm Methylenblau 1:10000. — *Reaktionsgemisch II:* 1,0 ccm 350 mg thymonucleinsaures Natrium von Kahlbaum (Gef. N. 14,86) in 100,0 ccm destilliertem H_2O gelöst. Sonst wie Gemisch I. Als Co-Ferment benutzten wir die Blutzellen wie im vorigen Versuch.

Zur vollständigen Reduktion von 355 mg Methylenblau sind fermentativen Dehydrierungen nach der Methode von Thunberg-Ahlgren verwenden wir die v. Euler angegebene Darstellung; an Stelle der Entfärbungszeit die Menge Wasserstoff, die in der Zeiteinheit vom Substrat auf das Methylenblau übertragen wird.

Die Zahlen berechnen sich aus dem Molekulargewicht des angewandten Methylenblaus und der Methylenblaumenge pro Ansatz, sowie aus der Entfärbungszeit in folgender Weise:

Molekulargewicht des Methylenblaus

$C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 2H_2O = 355$, 0,4 ccm Mb

1:10000 pro Ansatz entsprechen 0,04 mg Mb.

Zur vollständigen Reduktion von 355 mg Methylenblau sind 22400 ccm H_2 erforderlich: 0,04 mg Mb verbraucht also bei der Reduktion $\frac{22400 \times 0{,}04}{355} = 2{,}5$ ccm H_2, und die Entfärbungszeit eines Versuches beträgt t Minuten, es ergibt sich eine Reaktionsgeschwindigkeit von $\frac{2{,}5 \times 60}{t} = \frac{150}{t}$ ccm H_2 pro Stunde.

Tabelle II.

Vakuumrohr Nr.	Reaktionsgemisch	Co-Ferment ccm	Dehydrierungsgeschwindigkeit ccm H_2/Std.	Entfärbungszeit in Min.
1	I	—	3,6	42
2	I	—	3,8	40
3	I	0,1	4,1	38
4	I	0,1	3,8	39
5	I	0,2	4,4	34
6	I	0,2	4,3	35
7	I	0,2	4,7	32
8	I	0,3	4,8	31
9	I	0,4	5,2	29
10	II	—	3,3	46
11	II	—	3,3	45
12	II	0,2	3,8	39
13	II	0,2	3,7	41
14	II	0,2	4,1	38
15	II	0,2	4,2	36
16	II	0,2	3,8	39
17	II	0,2	4,3	35
18	II	0,2	3,8	40

In gleicher Weise wie in Tab. I liess sich auch die Mitwirkung des Co-Fermentes bei der Dehydrierung der Hefenucleinsäure zeigen (Nr. 1–9). Aus den Versuchen der Tab. II ergibt sich, dass wohl in den Versuchen mit Hefenucleinsäure und Thymonucleinsäure als Substraten eine Starke Wirkung des Co-Fermentes zu beobachten war, aber für die Dehydrierung der Thymonuclein-

säure, Hefenucleinsäure stärker ist.

Wir wollen uns an dieser Stelle ausschliesslich mit den interessanten Tatsachen beschäftigen, welche die Rolle unserer Dehydrogenase bei dem allmählichen Abbau der Nucleinsäure aufzuklären vermögen.

Die Klassifikation der Nukleasen bezieht sich bisher nur auf die Ribonucleinsäure, so kann man sich des folgenden Schemas bedienen.

TABELLE III.

Ribo (Desoxyribo) nuclease

1)	Ribopolynucleotide [Hefe-(Thymo)nucleinsäure]	+	Ribopolynucleotidase [Levene's Nucleinase, Jone's Tetranucleotidase, Nucleotidacidase]
	↓		
2)	Ribonucleotide [Mononucleotide]	+	Ribonucleotidase [Nucleophosphatase]
	↓		
3)	Ribonucleoside	+	Ribonucleosidase
	↓		
	Purin-, Pyrimidinbasen		

Wie die neuesten Arbeiten über die Aufspaltung der nativen Nucleinsäure zeigen, tritt erstens jedenfalls im Darm die Mononucleotide unter Einwirkung der Polynucleotidase ein. Ausserdem aber dort und auch im Blute Freisetzung der Phosphorsäure mit der Nucleoside unter Nucleotidasewirkung. Besonders ist die Darmschleimhaut fast frei von Nucleosidase, deswegen bleiben die Nucleoside sicher intakt. Nucleosidase ist ausschliesslich ein Stoffwechselferment der Organgewebe.

In der vorliegenden Arbeit hat man mit voller Sicherheit ein Ferment gefunden. Die geeingneten Wirkungsorte diese Fermentes im fermentativen Abbau der Nucleinsäure ist aber noch unklar. Wahrscheinlich spielt dieses Ferment als typische Dehydrogenasewirkung ein viel grössere Rolle im Nucleinstoffwechsel. Schliesslich glaube ich an gleichzeitiges Vorhandensein von Polynucleotidase, Nucleotidase und unserer Dehydrogenase als Darmferment auf den Nucleinstoffwechsel.

Zusammenfassung.

1. Die Geschwindigkeit der Mb-Reduktion durch Nucleinsäure in Gegenwart von Phosphatextrakten aus Kaninchendünndarm lässt sich durch Zugabe von Co-Ferment (aus Menschenblutzellen) beschleunigen.

2. Die Dehydrierung der Hefenucleinsäure ist etwas schneller als bei der Thymonucleinsäure.

3. Versuche mit Kaninchendünndarmextrakt unter Zusatz von Co-Ferment zeigen, dass der fermentative Abbau der Nucleinsäure durch Nuclease offenbar stufenweise, unter Mitwirkung unserer Dehydrogenase, erfolgt.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Professor Dr. K. Morinaka für die liebenswürdige Anleitung und für die Durchsicht meines Manuskriptes meinen ergebensten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Euler v. Hans und Erich Adler (1935): Hoppe-Seyler's Ztsch. **232**, 10.
Makino, K. (1934): Hoppe-Seyler's Ztsch., **225**, 147.
Makino, K. (1934): The Jour. of Bioch., **22**, 93.
Oppenheimer, C. Die Fermente und ihre Wirkungen, 5 Auflage, **1**.
Oppenheimer, C. (1936): Die Fermente und ihre Wirkungen (Supplement), Lieferung 4.
Tsuge, Y. (1935): Fermentforschung, **14**, 422.
Tsuge, Y. (1936): The Jour. of Biochem., **24**, 127.
Warburg, O. und Christian, W. (1931): Bioch. Ztsch., **242**, 206.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

FURTHER CONTRIBUTIONS TO THE MICRO DETERMINATION OF CHOLESTEROL.

By

MORIO YASUDA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute for Research in Physical Education, Ministry of Education, Tokio.)

(Received for publication, October 16, 1936)

In 1931 the writer has communicated on the micro determination of cholesterol in which the oxidative method of Okey (1930) was modified. During the last few years, studies on the determination of cholesterol have been reported by different workers. The oxidative method of the writer was criticized and modified to some extent by Miller, MacLachlan and Boyd (1933). Kirk, Page and Van Slyke (1934) devised a manometric oxidative method in which cholesterol digitonide was oxidized with chromic acid and then produced CO_2 was determined manometrically instead of measuring the consumption of chromic acid by iodometric titration as in case of oxidative method of Okey and the writer. Man and Peters (1933) reported a micro method by which 0.5 to 1.5 mg. of cholesterol were determined gravimetrically. Similar modifications of the gravimetric determination of cholesterol on micro scale have appeared elsewhere.

In 1934 Schoenheimer and Sperry made an important publication on the determination of cholesterol. The method consisted in the precipitation of cholesterol as digitonide to which Liebermann-Burchard reaction was applied. Although the principle was not adopted because of the troube that digitonin affects the color reaction, they have overcome it by filtering the color given by digitonin with the aid of photometer.

The writer, while working on the determination of the iodine number of sterols in tissues (1935), has found that sterols in digitonide made as usual, can be quantitatively separated from digitonin by treating with gracial acetic acid and ether. If color

reaction be applied to sterols thus separated, the colorimetric determination of cholesterol would be not only easier, but it would be more reasonable than other methods. The statement of Schoenheimer and Sperry may be worth citing: "....digitonin precipitates practically all natural sterols, not all of which give color reaction. Colorimetric methods, therefore, yield reliable values only if cholesterol is the sole sterol present."

In this communication a micro method was presented by which cholesterol in the tissue is determined colorimetrically after it was precipitated as digitonide and separated from digitonin. Essential procedures of the determination of this substance were also critically studied.

Ppocedures.

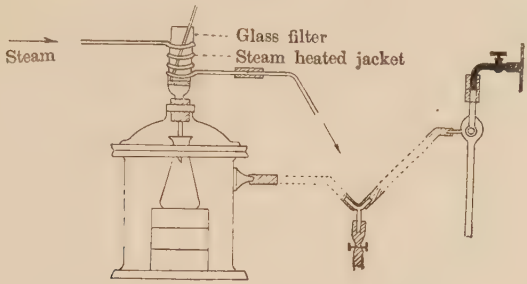
Principles—Although cholesterol digitonide is a stable substance being insoluble in most of the lipid solvents and water except hot absolute ethyl or methyl alcohol, it dissolves readily in warm gracial acetic acid whereby digitonide is split into cholesterol and digitonin. By adding ether, digitonin is precipitated while cholesterol is left in solution, consequently the two substances are easily separated by filtration. After removing acetic acid and ether by evaporation, cholesterol is dissolved in chloroform and transfered into a graduated cylinder in which the color reaction of Liebermann-Burchard is developed.

Special reagents—0.01 per cent chloroform solution of cholesterol (Merck) serving as a standard for the colorimetry; 0.5 per cent digitonin solution prepared by dissolving 1 gm. of digitonin (Merck) in 200 cc of 50 per cent alcohol; diluted acetone made by mixing equal volumes of redistilled acetone and water; diluted hydrochloric acid made by diluting 1 part of concentrated HCL with 4 parts of water; saturated watery solution of potassium hydroxide; gracial acetic acid, acetic anhydride, and concentrated sulphuric acid of good grade.

Special apparatus—Sintered glass filter of 2 cm. in diameter and about 15 cc volume; steam heated jacket consisting of a glass or copper coil in which the glass filter fits. These are the same

ones used in the oxidative determination of cholesterol (1931); filtering apparatus with suction (see Fig. 1).

Fig. 1. Filtering apparatus.



I. Determination of free cholesterol.

About 10 cc of alcohol-ether or alcohol-acetone extract of blood or tissue containing about 0.5 mg. of cholesterol are pipetted into a small Erlenmeyer flask (flask-A) to which 2 cc of digitonin solution are added. The mixture is heated gently to dryness on the water or steam bath. 10 cc of diluted acetone are added and the flask is kept on the steam bath for about a minutes until the content in the flask begins to boil. After a while the content is filtered through a glass filter. The inside of the flask and filter are washed once with 2 cc of redistilled acetone, two or three times with about 2 cc of ether, each time being sucked dry. Cholesterol digitonide in the flask-A is thus transferred into the glass filter and freed from impurities.

1 cc of gracial acetic acid and 3 cc of methyl alcohol are measured into flask-A, heated on the steam bath for few minutes, then poured into the filter with the aid of a small glass rod. The filter is set in the steam heated jacket so that the content of the filter is kept hot. Before that, the flask in the filtering apparatus in which waste filtrate was collected, is removed and a small flask (flask-B) is placed instead. Digitonide in the filter is dissolved in hot acetic acid and methyl alcohol by stirring up with the glass rod and filtered into the flask-B by suction. The filter is rinsed with 1 cc of methyl alcohol which is sucked in the same way into

the flask-B. The flask is then removed from the filtering apparatus and put on the steam bath to remove methyl alcohol by evaporation. A gentle suction facilitates the evaporation of methyl alcohol in a few minutes leaving acetic acid in the flask. After the removal of methyl alcohol which is judged by the disappearance of its smell, the flask is brought down from the steam bath and added with 10 cc of ether, then the flask is stoppered and kept standing for about half an hour with occasional shaking during which digitonin is completely precipitated.

The precipitate of digitonin is next removed by filtration through the glass filter, and cholesterol which is left in solution is collected in a flask (flask-C) in the filtering apparatus. The flask-B and the filter are washed with about 2 cc of ether and sucked into the flask-C. Ether and acetic acid are removed on the steam bath, the evaporation of acetic acid is not as easy as ether, but it is usually done within 10 minutes by applying suction. Cholesterol in the flask-C is then transferred into a graduated cylinder of 10 cc volume with successive small portions of chloroform, and the final volume is made to 5 cc with chloroform.

As a standard 5 cc of 0.01 per cent chloroform solution of cholesterol are measured into another graduated cylinder. 1 cc. of acetic anhydride and 0.2 cc of concentrated H_2SO_4 are pipetted into the cylinders which are then stoppered and well mixed. The colorimetric readings are made after 10 minutes.

Note—1. Regarding the extraction of lipids including cholesterol from blood and tissues the reader is referred to the communications of Bloor and Snider (1934), and Boyd (1936), and also to that of Schoenheimer and Sperry (1934) concerning the extraction of cholesterol from blood with alcohol-acetone.

2. The color reaction is taken place at the room temperature, when it is too high the cylinders should be placed in a thermostat of about 20°.

3. Methyl alcohol is used to dissolve digitonide with acetic acid. If, therefore, acetic acid in the glass filter is kept hot for a short time by heating, for instance, with a small direct flame for about 20 seconds, digitonide is easily dissolved without methyl

alcohol. In this case the steam jacket becomes unnecessary.

4. For the removal of digitonin precipitated by ether a small amount of purified asbestos is put in the filter to make a thin layer of asbestos on the mat of the glass filter so that the fine precipitate of digitonin can not pass through. The precipitate of digitonin on the mat is dissolved by adding a few cc of hot alcohol and filtered off. The filter is washed with ether to be ready for the next use.

5. When the glass filter is clogged and the filtration becomes hard, the filter is boiled with diluted alkali for about an hour on the steam bath and then washed with water.

II. Determination of total cholesterol.

To about 10 cc of alcohol-ether or alcohol-acetone extract of blood or tissues containing about 0.5 mg. of total cholesterol in a small flask (flask-A) 0.1 cc of saturated KOH is measured and heated gently on the steam bath for 15 to 20 minutes. At the end, the digest mixture in the flask is of about 2 cc volume. The mixture is neutralized with diluted HCL using one drop of phenolphthalein as an indicator, added directly to 2 cc of digitonin solution and evaporated carefully on the steam bath to almost dryness. The saponification of bound cholesterol and the formation of digitonide are accomplished by this procedure. 10 cc diluted acetone are put into the flask which is then heated on the steam bath for about a minute. Most of the excess digitonin and salts are dissolved in hot diluted acetone and filtered off through the glass filter. The flask and the filter are first washed with about 2 cc of diluted acetone and then with acetone and ether. Further procedures are the same as those of the determination of free cholesterol.

Discussion of the Procedures.

I. Separation of cholesterol from digitonide.

In the first place it must be testified whether or not the formation of digitonide and the separation of cholesterol from digitonin are completed by the above procedures.

Experiments were carried out on known amount of cholesterol: 5 cc aliquots of 0.01 per cent chloroform solution of cholesterol were measured into small flasks. Chloroform was evaporated and cholesterol was redissolved in 10 cc of alcohol-ether mixture (3:1), added to 2 cc of digitonin solution, then evaporated to dryness. Thus, cholesterol was precipitated as digitonide from which digitonin was removed by the procedure described above. Finally cholesterol was determined by colorimetry in which same aliquot of chloroform solution of cholesterol was used as a standard. Similar experiments were repeated on different aliquots—0.6 and 0.8 mg. of cholesterol. The results are presented in Table I which may definitely show that cholesterol is precipitated as digitonide and separated from the latter quantitatively with the reproducibility of 96.6±2.6 per cent in case of 0.5 mg. aliquots, 96.0±1.1 and 98.2±1.1 per cent in cases of 0.6 and 0.8 mg. aliquots respectively.

Table I.
Recovery of cholesterol by new method.

Aliquot cholesterol	No. of determinations	Cholesterol recovered	
mg.		mg.	per cent
0.50	12	0.483±0.013	96.6±2.6
0.60	12	0.576±0.007	96.0±1.1
0.80	3	0.778±0.009	98.2±1.1

II. Saponification of bound cholesterol and subsequent formation of digitonide.

It has been generally agreed that although free cholesterol is determined easily, whatever method may be used, the determination of bound or total cholesterol is accompanied by considerable difficulties. In previous communication (1931) the writer saponified bound cholesterol with approximately N sodium ethylate on the steam bath for 20 minutes. Boyd (1933) used saturated NaOH instead of sodium ethylate as the latter became unsatisfactory on standing. In later publication (1935) he changed the concentration of NaOH from 2 to 80 per cent and found that the results were apparently the same, showing that cholesterol esters were saponified

with a small amount of alkali. He called attention to the fact that the intensity of heating and the time of saponification were more important than the amount of alkali. The optimal conditon for the recovery of total cholesterol was to add 0.1 cc of saturated NaOH solution to an aliquot alcohol-ether extract containing 0.5 to 1.5 mg. of total cholesterol and to heat on the steam bath for 1.5 hours according to him. Man and Gildea (1932–33) and Man and Peters (1935) added 0.1 cc of KOH solution made by dissolving 50 gm. of KOH in 50 cc of water to the same amount of total cholesterol mentioned above, and heated for 1.5 to 2 hours on the hot plate for saponification. Kirk, Page and Van Slyke (1934) preferred a saturated alcoholic solution of NaOH with which cholesterol esters were saponified for 2.5 hours at 85°. They emphasized that the saponification of cholesterol esters required more care than any other step of the analysis. At the temperature below 85° the saponification was incomplete, and when the alkali treatment was too severe, the results were also too low, owing to the destruction of some cholesterol. Onizawa (1928–29) refluxed for 6 hours with saturated alcoholic solution of NaOH for saponification.

Schoenheimer and Sperry (1934), however, showed that only one drop of KOH solution made by dissolving 10 gm. of KOH in 20 cc of water was sufficient to saponify cholesterol esters contained in 0.2 to 0.5 cc of blood serum or whole blood at 37° to 40° for 30 minutes. Riegel and Rose (1936) who applied the method of Schoenheimer and Sperry to the determination of bile cholesterol found that ether extract of bile containing 0.5 to 5 mg. of total cholesterol were saponified by treating with 0.1 cc of 33 per cent KOH for 2 hours at 37 to 40°.

It may be surprising that the amount of alkali, temperature and the length of time for the saponification of bound cholesterol were considerably different even among recent workers. Since the completion of the saponification or the yield of bound cholesterol has been judged by the amount of digitonide which was produced by adding digitonin to the ether or petroleum ether extract of choresterol freed by saponification, the extraction of cholesterol after

saponification should be studied in connection with the method of saponification. So far the digest mixture of saponification was neutralized or slightly acidified after that cholesterol was extracted with successive small portions of lipid solvent. This procedure of extraction was not only tedious, but it had the danger that a part of cholesterol might be lost during the course of extraction. In the method of Schoenheimer and Sperry cited above, cholesterol was not extracted after the saponification, but it was precipitated as digitonide in the digest mixture. All these findings seemed to be significant improvements in the determination of total cholesterol to be confirmed by after proof.

The writer has therefore attempted the following experiments: cholesterol esters synthetized after the description of Hoppe-Seyler and Thierfelder (1924), alcohol-ether and alcohol-acetone extracts of pig serum were saponified under various conditions. The melting points of synthesized cholesterol esters were 77°, 76° and 42° for cholesteryl palmitate, stearate and oleate respectively. Although cholesteryl stearate showed relatively low melting point, it was used as substrate. Alcohol-ether and alcohol-acetone extracts were made by pipetting 15 cc of pig serum into 250 cc volumetric flasks containing about 200 cc of hot alcohol-ether (3:1) or alcohol-acetone (1:1) followed by keeping the flasks on the steam bath for few minutes and making up to the volume with alcohol-ether or alcohol-acetone after cooling. 10 cc of these extracts were corresponding to 0.6 cc of the serum. As saponifying reagents 0.1 cc of saturated KOH or 2 cc of approximately N sodium ethylate were used for 0.8 mg. aliquots cholesterol esters dissolved in 10 cc of alcohol-ether, and for 10 cc of the serum extracts. The temperature and the time of saponification varied as may be shown in Table II. In all cases cholesterol freed by saponification was precipitated by adding digtonin to the digest mixture.

It is obvious that cholesteryl stearate was completely saponified by heating with KOH on the steam bath for 20 minutes. The use of sodium ethylate gave lower values which, however, agreed with the results presented in previous communication (1931). The saponification of cholesterol esters either synthetized or contained

TABLE II.

Saponification of bound cholesterol under various conditions.

Substrate	Aliquot (cholesterol in aliquot)	No. of determinations	Saponification		Average recovery of cholesterol	
			Reagent	Time and temp.		
	mg.				mg.	per cent
Cholesteryl stearate	0.8 (0.475)	6	C_2H_5ONa	20 min. on steam bath	0.447±0.013	94.5±2.7
	"	8	KOH	" "	0.465±0.007	98.6±1.4
Cholesteryl palmitate	0.8 (0.495)	3	KOH	30 min. at 37°	0.402	81.5
	"	5	"	60 min. at 37°	0.462	94.0
Cholesteryl oleate	0.8 (0.475)	6	KOH	20 min. on steam bath	0.460	96.8
Alcohol-ether extract of pig serum	10 cc.	4	KOH	20 min. on steam bath	0.507	
	"	5	"	30 min. at 37°	0.370	
	"	5	"	60 min. at 37°	0.488	
Alcohol-acetone extract of pig serum	10 cc.	2	KOH	20 min. on steam bath	0.508	
	"	6	"	30 min. at 37°	0.380	
	"	5	"	60 min. at 37°	0.480	

in serum extracts was found insufficient when the temperature was 37° and the time was 30 minutes, but it was almost completed when the time was prolonged to 60 minutes. It may be of significance that the saponification of cholesterol esters was completed at a low temperature as 37° if enough time was allowed.

Since cholesterol was preciptated with digitonin in the saponified mixture in which considerably large amount of salts produced by the neutralization, glycerol and fatty acids were contained, the influence of these substances on the formation of digitonide was questioned.

To 0.5 mg. of cholesterol dissolved in 10 cc of alcohol-ether 0.1 cc of saturated KOH was added heated on the steam bath for 20 minutes, neutralized and otherwise treated as in case of bound cholesterol. The average recovery of cholesterol of 12 determinations was 0.484±0.007 mg. or 96.5±1.4 per cent. To the same aliquots cholesterol dissolved in 10 cc of alcohol-ether was added 0.1 cc of glycerol (specific gravity=1.26), and the saponifying procedures were carried on as before. The recovery of cholesterol of 4 determinations was 0.476 mg. or 95.5 per cent. The influence of fatty acids was not studied as it seemed unnecessary. These results would show that the formation of digitonide was not affected by the existence of salts nor by glycerol to any considerable extent.

III. Separation of digitonide by centrifuging.

In the present method cholesterol digitonide was separated by the filtration through a glass filter, but it seemed desirable to see if centrifuging was available for this purpose as in the method of Schoenheimer and Sperry (1934).

0.5 mg. of cholesterol dissolved in 5 cc of alcohol-acetone (1:1) were taken into a 10 cc centrifuge tube, 2 cc of digitonin solution were added, mixed well with a small glass rod, and left over night. The tube was then centrifuged for 15 minutes, the supernatant liquid was carefully drawn off, and the precipitate in the tube was washed once with acetone, twice with ether, each time being centrifuged. After the last wash ether was removed, the tube was put in a small beaker containing small amount of hot water. About

1 cc of gracial acetic acid was measured into the tube and kept warm on the steam bath. Digitonide together with remaining excess digitonin was dissolved in warm acetic acid with the aid of a glass rod. The tube was cooled to room temperature after that 10 cc of ether were added and mixed well with the glass rod. Digitonin flocurated promptly which was separated by filtering through a glass filter after 30 minutes. Cholesterol in the filtrate was freed from the solvents by evaporating on the steam bath, and determined by colorimetry. The average recovery of cholesterol of 10 determinations was 0.486 mg. or 97.2 per cent of the theory showing that the separation of digitonide by centrifuging was satisfactory.

Tissue extracts were then used as substrates: aliquots alcohol-ether extract of the rabbit liver and alcohol-acetone extract of pig serum were taken into small flasks, saponified with KOH on the steam bath, neutralized, added to digitonin solution and left over night. The content of the flask was transferred into a tube, and centrifuged for 15 minutes. The supernatant liquid was drawn off, the inside of the flask was first washed with acetone which was transferred into the tube to wash the precipitate in it, and centrifuged. Next, the flask and the tube were washed twice with ether, and further treated as described above. On other hand, total cholesterol of the same aliquots tissue extracts was determined after the description already presented in this communication, that is digitonide was formed by evaporating to dryness on the steam bath and separated by filtration. In Table III the recovery of total cholesterol by both methods are compared.

The Following table shows that the recovery of cholesterol in tissue extracts was slightly, about 3 per cent, lower when digitanide was separated by centrifuging, and it was considered that a part of digitonide was lost during repeated centrifugings. It was reminded that centrifuging was found inadequate when digitonide was treated with water to remove excess digitonin as in case of oxidative or gravimetric determination of cholesterol (1930). In the present method the precipitate of digitonide is not to be separated from the water solution so that the centrifuging may

Table III.
Separation of digitonide by filtration or by centrifuging.

Tissue extract*	No. of determinations	Total cholesterol in aliquot tissue extract		
		Digitonide separated by		
		Filtration	Centrifuging	Difference
		mg.	mg.	per cent
Rabbit liver	4	0.649±0.014	0.629±0.011	3.1
Pig serum	6	0.576±0.010	0.557±0.012	3.3

* Stock solutions of tissue extracts. As aliquots 8 cc of alcohol-ether extract of the rabbit liver, and 10 cc of alcohol-acetone extract of pig serum were used.

be substituted for the filtration if utmost precautions be paid. However, the filtrative separation of digitonide seems to be safer than to apply the centrifuge, and besides the former would be more suitable for the thorough washing of the precipitate.

IV. Liebermann-Burchard Reaction.

Of the color reactions of cholesterol the Liebermann-Burchard reaction is regarded as most adequate for the determination of cholesterol by colorimetric principle, although the reaction is not very stable being influenced by the temperature, time, and the amount of the reagent. In one method 1 cc of acetic anhydride and 0.1 cc of concentrated sulphuric acid were added to 5 cc of chloroform solution containing about 0.5 mg. of cholesterol, while in others 2 cc of acetic anhydride and 0.1 cc of sulphuric acid were used for apparently the same amount of cholesterol. In the latter case the color developed eariler and more intensively at its maximum than the former. When the amount of sulphuric acid was increased to 0.2 cc (0.3 cc of H_2SO_4 caused precipitation of cholesterol in chloroform), the color reaction was not only greatly accelerated, but the tone of the color was rather bluish-green compared with the familiar green color developed by 1 or 2 cc of acetic anhydride and 0.1 cc of sulphuric acid. After changing the amounts of these reagents in different proportions, the writer found that the develop-

ment of the color for the colorimetric purpose was most satisfactory when 1 cc of acetic anhydride and 0.2 cc of sulphuric acid were used, whereby the color reached a maximum within 10 minutes at room temperature and kept it for about 10 minutes. Schoenheimer and Sperry (1934) commented on this reaction that the higher the temperature and the larger the amount of sulphuric acid, the earlier the color reached a maximum and the earlier it faded, but the maximum was the same. The last few words of this statement that the maximum was the same are questioned by the writer.

Summary and Conclusions.

For a long time the gravimetric digitonin method has been regarded as a most reliable one for the determination of cholesterol, but it has not been generally adopted because it needed large amounts of cholesterol and expensive digitonin for single determination, and the procedures were complicated and time consuming. Recent workers have therefore attempted to devise a substitute for the gravimetry. As the gravimetry needs relatively a large amount of the material, however it may be modified, a method consisted of different principle was searched (1931). The oxidative micro method was intended to satisfy the above need which enabled one to determine less than 1 mg. of cholesterol with simple procedures. The gasometric micro determination (1934) was next published by which much less cholesterol was determined. These two methods agreed in oxidizing cholesterol digitonide with chromic acid, but the determination of lipids including cholesterol by oxidative principles was not free from discussion that the oxidation of the contaminated materials would alter the final result (1933). Meanwhile, the colorimetric procedure which was thought less adequate than the digitonin method because of the well known disadvantage was revived by Schoenheimer and Sperry who applied the color reaction to cholesterol digitonide. The two familiar principles of cholesterol determination, digitonin and Liebermann-Burchard reaction, were thus combined in one method. The idea was not entirely new, but no one had ventured

to realize it, as digitonin was known to give color—yellowish brown—in Liebermann-Burchard reaction. The above authors took the advantage of the photometer through which the color given by digitonin was filtered.

In the method of this communication cholesterol was precipitated as digitonide and freed from contaminated substances in the lipid extract by washing after that digitonin of digitonide was removed by simple technique, leaving only cholesterol for the colorimetry. Such a treatment would undoubtedly be more desirable than to apply the color reaction to digitonide directly, and the objections raised to the old colorimetry of cholesterol would be eliminated.

The saponification of bound cholesterol, subsequent formation of digitonide and its separation were critically studied, and as the result the whole procedures of cholesterol determination were significantly simplified.

The writer wishes to acknowledge his indebtedness to Professor S. Kakiuchi of Tokio Imperial University for helpful criticism of this work.

BIBLIOGRAPHY.

Bloor, W. R. and Snider, R. H. (1934): J. Biol. Chem., **107**, 459.
Boyd, E. M. (1933): J. Biol. Chem., **101**, 323.
Boyd, E. M. (1936): J. Biol. Chem., **114**, 223; **115**, 37.
Boyd, E. M. (1935): J. Biol. Chem., **110**, 61.
Hoppe-Seyler und Thierfelder (1924): Physiol. und Pathol. Chemische Analyse, 329, Berlin.
Kirk, E., Page, I. H. and Van Slyke, D. D. (1934): J. Biol. Chem., **106**, 203.
Man, E. B. and Peters, J. P. (1933): J. Biol. Chem., **101**, 685.
Man, E. B. and Gildea, E. F. (1932–33): J. Biol. Chem., **99**, 43.
Okey, R. (1930): J. Biol. Chem., **88**, 367.
Onizawa, J. (1928–29): J. Biochem., **10**, 45.
Riegel, C. and Rose, H. J. (1936): J. Biol. Chem., **113**, 117.
Schoenheimer, R. and Sperry, W. M. (1934): J. Biol. Chem., **106**, 745.
Yasuda, M. (1931): J. Biol. Chem., **92**, 303.
Yasuda, M. (1935): Nihon Seikag. Kh. (Bull. of Biochem. Soc. of Japan), **10**, 56.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

ON THE LIEBERMANN-BURCHARD REACTION OF BOUND CHOLESTEROL.

By

MORIO YASUDA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute for Research in Physical Education, Ministry of Education, Tokio.)

(Received for publication, October 16, 1936)

Working on the determination of cholesterol by the colorimetric procedure, the writer has noticed that the Liebermann-Burchard reaction of bound cholesterol was not quite the same as that of free cholesterol. In hand books nothing particular was described as to the color reaction of bound cholesterol, except that cholesterol esters give the color reactions of Liebermann-Burchard, Salkowski and so forth as cholesterol itself.

The following experiments would show the difference between free and bound cholesterol with regard to the Liebermann-Burchard reaction which is an active principle for colorimetric determination of cholesterol.

Direct colorimetry of bound cholesterol—Aliquots 0.8 mg. of cholesteryl palmitate dissolved in chloroform were taken into graduated cylinders, and the volume was made to 5 cc with chloroform. Into another graduated cylinder 0.5 mg. of free cholesterol dissolved in 5 cc of chloroform were measured in like manners. To both of them 1 cc of acetic anhydride and 0.2 cc of concentrated H_2SO_4 were added to develop the color. 10 minutes after the addition of H_2SO_4 the colorimetry was to be done as usual, but the difference in the color tone between free and bound cholesterol made the colorimetry impossible. When, however, the color of bound cholesterol was matched against standard free cholesterol with the aid of colored glass, surprisingly high values were obtained. The amount of cholesterol contained in cholesteryl palmitate was approximately 25 per cent higher than the theory.

Similar results were found when cholesteryl stearate and

oleate were used as materials. With 2 cc of acetic anhydride and 0.1 cc of H_2SO_4, or 1 cc of acetic anhydride and 0.1 cc of H_2SO_4, the difference of the color tone was not distinct, but the results of the colorimetry were again as high as before.

Application of digitonin colorimetric method—Same aliquots cholesterol esters i.e. 0.8 mg. of cholesteryl palmitate, stearate and oleate were saponified, and cholesterol was determined by the method described in the foregoing communication which may be called digitonin colorimetric method because the method is based on the application of digitonin and the colorimetry. The results of repeated determinations are tabulated in Table I which shows that cholesterol found by this method agreed with the theoretical amount within a few per cent. In the synthetic preparation of cholesterol esters, cholesterol and fatty acids were melted at 200° for about 4 hours. It was at first feared that cholesterol was denatured by heating at such high temperature so that the color reaction of synthetized cholesterol esters differed from that of free chelesterol. However, the above experiment has shown that cholesterol freed by the saponification of those cholesterol esters was not changed from genuine free cholesterol so far as the Liebermann-Burchard reaction was concerned.

Experiment on cholesterol ester isolated from pig serum—To confirm the above findings cholesterol esters isolated from pig serum was subjected to analysis as an example of naturally occuring bound cholesterol. Cholesterol ester was isolated from about a liter of pig serum according to the following procedures: freshly obtained pig serum was treated with 3 times as much alcohol, left standing at room temperature for 3 hours, and then filtered. The filtrate was rejected, and the precipitate was extracted with absolute alcohol at 37° for 3 days. Alcohol extract, after it was filtered, was kept in the ice chamber for 2 days. Cholesterol esters that precipitated in alcohol were collected, purified by reprecipitating in alcohol and dried. Throughout the whole procedure the temperature was kept below 37°. The melting point of this preparate was 69° indicating that it was the mixture of cholesterol esters.

Direct colorimetric and digitonin colorimetric method were

applied to this material as in case of synthetized cholesterol ester. The results are shown in Table I.

TABLE I.

Determination of bound cholesterol by direct colorimetric and digitonin colorimetric methods.

Material	Aliquot (theoretical amount of cholesterol in aliq.)	Diret colorimetric			Digitonin colorimetric		
		No. of determinations	Cholesterol found	Diff. from the theory	No. of determinations	Cholesterol found	Diff. from the theory
	mg.		mg.	per cent		mg.	per cent
Cholesteryl palmitate	0.8 (0.49)	4	0.61	+24.5	13	0.46 (±0.006)	−6.1
Cholesteryl stearate	0.8 (0.47)	4	0.59	+25.2	16	0.47 (±0.013)	0
Cholesteryl oleate	0.8 (0.47)	4	0.60	+27.6	6*	0.46 (±0.010)	−2.3
Chole. ester in pig serum	0.8 (0.48)	6	0.58	+23.0	4	0.43 (±0.007)	−10.4

* Cited from Table II. of the foregoing communication.

It is known that neither palmitic nor stearic acid has influence on the Liebermann-Burchard reaction. Only oleic acid gives color when a large amount is used. However, the amount of oleic acid to be contained in 0.8 mg. of cholesteryl oleate used as aliquots in the above experiments was less than 0.5 mg. which were not sufficient to produce color to any extent.

SUMMARY.

Although bound cholesterol gives the color reaction of Liebermann-Burchard like free cholesterol, the tone and intensity of the color differ between them. The differenc of the color tone is not distinct when relatively large amount of acetic anhydride and small amount of sulphuric acid are used, but the intensity of the color of bound cholesterol is absolutely high compared with that of corresponding amount of free cholesterol.

The writer is expressing cordial thanks to Professor S. Kakiuchi of Tokio Imperial University for helpful suggestions for this work.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

STUDIEN ÜBER DIE ARGINASE.

Von

TAKEO IWABUCHI.

(*Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.*)

(Eingegangen am 27. Oktober 1936)

Arginasebestimmung wurde bisher meistenteils derart durchgeführt, dass man den durch Arginasewirkung entstandenen Harnstoff mit der Ureasemethode bestimmte. Diese Methode ist zwar an sich zuverlässig, doch ist sie auch mit einigen Lästigkeiten verbunden: Vor der Mischung der Versuchslösung mit der Urease muss die Arginase inaktiviert, P_H der Lösung auf 7 eingestellt, und dazu noch Destillieren des Ammoniaks ausgeführt werden. Bei der Untersuchung über Einflüsse verschiedener Substanzen auf die Arginase muss auch eine mögliche Beeinflussbarkeit der Urease durch diese Substanzen in Betracht gezogen werden, sodass der durch Destillation erhaltene Ammoniakgehalt nicht immer der quantitativen Veränderung der Arginasewirkung parallel geht. So habe ich versucht, das nach der Hydrolyse durch Arginase ungespalten zurückgebliebene Arginin zu bestimmen. Unter diesem Gedankengange wurde schon von einigen Autoren die Abwägung des als Argininflavianat zur Fällung gebrachten Arginins für die Arginasebestimmung angewandt. Aber dieses gravimetrische Verfahren ist bei der Ausführung zahlreicher Experimente sehr unpraktisch. So habe ich gemäss der Tatsache, dass durch Reduktion der Flaviansäure in alkalischer Reaktion tief rote Verfärbung entsteht, das Argininflavianat kolorimetrisch zu bestimmen versucht. Als Reduktionsmittel wurde Stannochlorid verwendet und zur Auflösung des in alkalischer Reaktion entstehenden Stannohydroxydes wurde Kaliumnatriumtartrat (Seignette-Salz) hinzugesetzt.

Reagentien:

1) Flaviansäure (1-Naphthol-2,4-dinitro-7-Sulfonsäure+3 Molekül Kristallwasser): Von Firma Takeda, Osaka. Diese Flaviansäure wurde zur Herstellung der Standardlösung und zur Fällung des Arginins gebraucht. Zuerst habe ich das Präparat aus heisser 10% Salzsäure umkristallisiert und die in Vakuum neben Kalilauge getrocknete Säure in Kaliumsalz übergeführt. Das Salz enthält 1½ Molekül Kristallwasser. Kolorimetrische Vergleichung dieses Salzes mit dem Handelspräparat ergab keine Differenz. Daher wurde die Flaviansäure von Takeda ohne weiteres verwendet.

2) 5% Kalilaugelösung.

3) 20% Kaliumnatriumtartratlösung.

4) 5% Zinnchlorür-Salzsäurelösung: 5 g Zinnchlorür zur Analyse wurde in 100 ccm 1%iger Salzsäure aufgelöst und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Diese Lösung zeigte eine weissliche Trübung, konnte aber ohne weiteres verwendet werden. Sie ist ungefähr 10-15 Tage brauchbar, aber darüber hinaus nicht wegen der Abschwächung des Reduktionsvermögens.

Zur ganz klaren rötlichen Verfärbung war die folgende Menge der Reagentien am geeignetesten.

Flaviansäurelösung	1.0 ccm
5% Kalilauge	1.0 „
20% Seignettesalz	4.0 „
5% Zinnchlorür-Salzsäurelösung	1.0 „
mit Wasser auf	10.0 „

Nach dem Auffüllen mit Wasser bis zur Marke muss das Gemisch stark geschüttelt werden. Die maximale Farbentwicklung ist im Sommer in ca. 5 Minuten und im Winter in ca. 10 Minuten zu erreichen und die Farbintensität bleibt wenigstens 1 Stunde unverändert. Seignettesalz braucht man nicht genau 4.0 ccm zu messen, es kann ±20% variiert werden, aber 1 ccm Kalilauge soll möglichst genau abgemessen werden, sonst entsteht in der Lösung eine Trübung, die selbstverständlich die Kolorimetrie unmöglich macht.

Zuerst wurde der Konzentrationsbereich der Flaviansäure fest-

gestellt, in dem der Flaviansäuregehalt mit dem Farbgrad parallel geht. Es ergab sich, dass bei Kolorimetrie, die nach oben erwähnter Vorschrift unter Verwendung von 1.0 ccm Flaviansäure zwischen $M/50$ und M 3000 Lösung ausgeführt wird, der Farbgrad genau der Flaviansäurekonzentration proportional ist.

Weiter wurde Argininmonoflavianat aus Argininnitrat hergestellt und eine bestimmte Menge des getrockneten umkristallisierten Salzes abgewogen, 2 Äquivalente Alkali zugesetzt und in Lösung gebracht, um eine $M/200$ Lösung zu bereiten. Als diese Lösung mit $M/200$ Flaviansäure, wie oben beschrieben, kolorimetrisch verglichen wurde, stimmte der Färbungsgrad des Argininflavianats, wie aus der Tabelle I ersichtlich, innerhalb den zu erlaubenden Fehlergrenzen mit dem der Flaviansäure überein. Man kann den Argininingehalt aus der ermittelten Flaviansäuremenge errechnen.

Zur kolorimetrischen Bestimmung wird das Arginin zuerst aus der Versuchslösung als Flavianat niedergeschlagen und es muss, was bei ziemlich starker Azidität der Lösung zu verwirklichen ist, Monoflavianat sein. Mit Rücksicht auf die beim fermentativen Versuch auszuführende Enteiweissung brauchte ich zur Ansäuerung Trichloressigsäure. Die Flavianatfällung wird in 10 ccm Zentrifugenglas ausgeführt, das wie Messzylinder graduiert und mit Glasstopfen versehen ist.

Zu 1.0 ccm $M/200$ Argininmonohydrochloridlösung wurde 1 ccm 8%iger Trichloressigsäure, ferner 1 ccm 3% Flaviansäure hinzugefügt und die Glaswand stark (100 200 Mal) gerieben, so dass sich Flavianat schön kristallisiert abscheidet. Der Niederschlag wird nach etwa 30 Minuten abzentrifugiert und 2 Mal mit absolutem Alkohol gewaschen, um den Überschuss von Flaviansäure zu entfernen. Dann wurden 1.0 ccm Kalilauge und 4.0 ccm Seignettesalz hinzugefügt. Der Niederschlag wurde am siedenden Wasserbad aufgelöst, nach Abkühlen 1.0 ccm Zinnchlorür-Salzsäure-Lösung hinzugesetzt und mit Wasser auf 10 ccm verdünnt und gut gemischt. Diese Lösung wurde mit 1.0 ccm $M/200$ Flaviansäure, die mit Zinnchlorür verfärbt worden war, kolorimetrisch verglichen, wobei eine Übereinstimmung innerhalb der experimentellen Fehlergrenze erzielt wurde (Tabelle II). Ich möchte noch hinzufügen, dass die

Flavianatfällung ohne Abkühlen schon bei Zimmertemperatur vollständig vonstatten geht, und dass das Argininflavianat, falls es vollständig abgeschieden wird, schnell von selbst zu Boden sinkt und eine klare überstehende Flüssigkeit liefert. Anstatt 1.0 ccm 5% Kalilauge kann man 1.0 ccm 2.5% Lithiumhydroxyd verwenden, worin sich das Argininflavianat ohne Erhitzen glatt auflöst. Da eine geringe Menge absoluten Alkohols keinen Einfluss auf den Farbgrad ausübt, brauchte im Versuch der nach dem Auswaschen am Boden zurückgebliebene Alkohol nicht verdunstet werden.

Nun wandte ich diese Kolorimetrie zur Arginasebestimmung an, wobei zuerst festgestellt wurde, dass aus dem durch Trichloressigsäure enteiweisst erhaltenen Filtrat das Argininflavianat unvollständig ausgeschieden wird. Dieses Hindernis liess sich aber durch Kaolinbehandeln des Filtrats leicht beseitigen. Ich bestimmte bei 37° die Arginasewirkung folgendermassen:

$M/10$ Argininmonohydrochlorid	2.0 ccm	
$M/10$ Natronlauge	1.0 „	
Wasser	3.0 „	PH 9.2
Puffer (Glykokoll-Natron)	2.0 „	
Fermentlösung	2.0 „	

Die endliche Argininkonzentration ist $M/50$. Diesem Gemisch wird eine geringe Menge Toluol zugesetzt. Davon werden zur bestimmten Zeit 3.0 ccm genommen und die gleiche Menge 8%iger Trichloressigsäure hinzugesetzt, nach ca. 15 Minuten filtriert, dem Filtrat ca. 0.3 g Kaolin zugesetzt, geschüttellt und nach etwa 10 Minuten filtriert. 1.0 ccm von diesem Filtrat wird 1 ccm 3%iger Flaviansäure hinzugefügt, mit einem Glasstäbchen an der Wand kräftig gerieben, sodass sich Flavianat ausscheidet. Dann wird auf obenbeschriebene Weise die kolorimetrische Untersuchung ausgeführt, wobei die Vergleichslösung aus 1.0 ccm $M/200$ Flavinsäure herzustellen ist.

Mit dieser Methode habe ich zuerst die optimale Azidität der Arginase bestimmt. Zusammensetzung der Versuchslösung wird im experimentellen Teil angegeben. Als Arginase wurde dialysiertes Autolysat der Schweineleber verwendet, welches wegen starker Aktivität und geringen Eiweissgehalts den von manchen Autoren

gebrauchten Glyzerinextrakt übertrifft. Der Versuch fiel bei P_H 9.3 (bei 37° eine Stunde) am stärksten aus, wie Tabelle III zeigt, was mit den Angaben von Edlbacher und Bonem (1925), Hunter und Morrell (1933) und Kamiya (1935) gut übereinstimmt.

Dann wurde es bei P_H 9.2 mit $CaCl_2$, $CoCl_2$, $NiSO_4$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, NaF, KCN, $K_4Fe(CN)_6$ und $K_3Fe(CN)_6$ daraufhin untersucht, ob diese Substanzen auf die Arginase gewisse Einflüsse ausüben können. So konnte ich bei 1 stündigem Versuch und 37° in den Grenzen des Zusatzes von 1.0 ccm $M/100$—$M/5500$ Lösung weder Aktivierung noch Hemmung konstatieren (Tabelle V). Aber unter derselben Bedingung wurde mit $MnSO_4$ eine starke Aktivierung festgestellt. Die Aktivitätssteigerung betrug beim Zusatz von 1.0 ccm M 100, $M/500$ oder $M/5000$ $MnSO_4$ 30, 26 resp. 21% (Tabelle IV). Klein und Ziese (1935) gaben an, dass die Arginase durch Mangansalz aktiviert werden kann, während nach Kirian und Solowjew (1935) das Mn-ion die Arginase nicht zu aktivieren imstande sei. Edlbacher und Zeller (1936) schlossen sich der Ansicht von Klein und Ziese an. Aus meinen Experimenten geht ebenfalls hervor, dass man im Manganoion einen Aktivator der Arginase ersehen kann.

Was die Verteilung der Arginase anbetrifft, muss ein Vorversuch angestellt werden, um zu entscheiden, ob der Arginasegehalt in frischen Organen nach der Autolyse gewisse quantitative Veränderungen erfährt und ob der enteiweisste Organsaft oder das Autolysat unter den obenangeführten Bedingungen irgendeine durch Flaviansäure fällbare Substanz enthält. So habe ich zuerst Kaninchen-Leber, Niere und Hoden zermahlen und 5 faches Volumen 0.85%iger NaCl-Lösung hinzugesetzt. 2.0 ccm davon wurden sofort zum Versuch der Spaltung des Arginins verwendet und zugleich wurde der Spaltunggrad mittels der Ureasemethode bestimmt, wobei das Resultat der beiden Bestimmungsverfahren völlig übereinstimmend war (Tabelle VI). Dass beim sofortigen Versuch die zugesetzte Argininmenge unverändert wiederzufinden war und die Ureasemethode und die Kolorimtrie einen völlig übereinstimmenden Wert ergaben, weist darauf hin, dass im ent-

eiweissten Organsaft unter den obengenannten Bedingungen keine durch Flaviansäure fällbare Substanz nachweisbar ist.

Dann wurden Leber, Niere, Hoden und Muskel von Kaninchen, Hund und Huhn zermahlen und sobald oder nach der Autolyse auf die Arginasemenge hin untersucht. Wie die Tabelle VII zeigt, liess der Versuch mit der frischen Organsuspension, welche durch Zusatz von 5 fach grossem Volumen physiologischer Kochsalzlösung zu den zermahlenen Organen erhalten wurde, die Existenz der Arginase in jedem Organe, abgesehen vom Muskel, nachweisen (Tabelle VII). Das Ferment war besonders reichlich bei Hunden und Kaninchen in Leber und beim Huhn in Niere vorhanden. Das Verhältnis war etwas anders, als der Versuch mit der Fermentlösung ausgeführt wurde, welche aus den Organen durch 3 tägige Autolyse bei 37° unter Zusatz von Toluol-Chloroform und dann nach der Dialyse 3 Tage lang gegen Wasser erhalten wurde. Die Arginase war nur in Leber des Kaninchens und Hunden nachzuweisen, aber ihre Aktivität war stark abgeschwächt in Vergleich mit der von den frischen Organaufschwemmungen. In den übrigen untersuchten Autolysaten, einschliesslich der Hühnerniere, wurde keine Arginasewirkung beobachtet (Tabelle VIII). Bei der Untersuchung auf das Vorkommen der Arginasen mussten frische Organe zum Experiment genommen werden.

Wie aus den obigen Experimenten hervorgeht, wurde im Muskel keinesfalls Arginase nachgewiesen, wie es schon früher von Edlbacher und Röthler (1925) berichtet wurde. Klein und Ziese (1935) haben kürzlich angegeben, dass der Muskel, besonders der von Ratten, Arginin nicht zu spalten vermag, aber beim Zusatz von Mn eine Arginasewirkung in Erscheinung treten kann. Dem anschliessend, berichteten Edlbacher und Zeller (1936), dass in der Tauben-Muskulatur eine sehr intensive Arginase-Reaktion bei Gegenwart von Mangansalzen ausgelöst wird. Die Arginaseaktivierung durch Manganosalz wurde, wie schon oben angegeben, festgestellt. Mein Experiment ergab aber, dass der frische Muskel von Ratte und Taube unabhängig von Anwesenheit des Mn selbst nach 24 Stunden das Arginin nicht zu spalten vermag.

Weiter haben Hellerman und Perkins (1936) berichtet,

dass Urease in Anwesenheit von Co, Mn oder Ni das Arginin zu hydrolysieren imstande sei. Mein Experiment ergab aber, dass bei Verwendung sowohl der käuflichen Urease als auch des bei uns aus Sojabohne hergestellten Präparats keine Arginasewirkung durch Zusatz von solchen Salzen hervorgerufen wurde. Somit konnte ich, wie vorstehend berichtet, an Hand der Kolorimetrie des Arginins Arginasewirkung von den verschiedensten Richtungen betrachten.

Experimenteller Teil.

Argininmonohydrochlorid wurde aus Gelatine, Kokkō Marke von Nitta, Tokyo nach Bergmann und Zervas (1927) hergestellt. Genaue Vorschrift ist in Organic Syntheses XII (1932) vorhanden.

Die Gewinnung der Arginaselösung wurde wie folgt ausgeführt. 500 g zerkleinerter frischer Schweineleber wurden 2500 ccm Wasser und ca. 3 ccm 36%iger Essigsäure zugesetzt. Unter Zusatz von Chloroform und Toluol wurde das Gemisch bei 37° 72 Stunden autolysiert und dann das Filtrat 3 Tage gegen Wasser dialysiert. In Eiskammer aufbewahrt ist die Fermentlösung monatelang haltbar.

Pufferlösung war $M/2$ Essigsäure-Acetat oder $M/10$ Glykokoll-Natron. P_H wurde an der Versuchslösung mittels Indicatorpapier bestimmt. Versuchstemperatur war, sonst nichts angegeben, 37°.

In den nachstehenden Tabellen der Fermentversuche wird die in 1 ccm des enteiweissten Filtrats gefundene Argininmenge angegeben. Falls keine Argininspaltung entsteht, ist die nachgewiesene Argininmenge 1.742 mg.

I. Kolorimetrie des reinen Argininflavianats.

Tabelle I.

M/200 Argininflavianat	als Flaviansäure		als Arginin		%	Fehler %
	ber. mg	gef. mg	ber. mg	gef. mg		
0.5 ccm	0.785	0.789	0.435	0.437	101	1
1.0 „	1.570	1.586	0.870	0.878	101	1
2.0 „	3.141	3.207	1.742	1.769	102	2

II. Kolorimetrische Bestimmung des Arginins an seiner reinen Lösung.

Tabelle II.

als Flaviansäure		als Arginin		%	Fehler %
ber. mg	gef. mg	ber. mg	gef. mg		
1.571	1.547	0.870	0.859	99	1

III. Ph-Optimum der Arginase (1 stündiger Versuch).

$M/10$ Argininmonohydrochlorid	2.0 ccm
$M/10$ Natronlauge	a „
Wasser	4–a „
Puffer	2.0 „
Fermentlösung	2.0 „

Tabelle III.

M/10 NaOH ccm	0	0	0.1	0.2	1.0	2.0	2.0
Puffer	Essigsäure-Acetat		Glykokoll-Natron				
Ph	6.0	6.2	7.7	8.3	9.3	10.2	11.2
Arginin mg	1.44	1.37	1.26	1.25	1.15	1.38	1.61
Arginin-spaltung%	17	21	28	28	34	21	7.5

IV. Arginaseaktivierung des Manganosalzes (1 stündiger Versuch bei Ph 9.2).

$M/10$ Argininmonohydrochlorid	2.0 ccm
$M/10$ Natronlauge	1.0 „
$MnSO_4$ Lösung	1.0 „
Wasser	2.0 „
$M/10$ Glykokollnatronpuffer	2.0 „
Fermentlösung	2.0 „

Tabelle IV.

$MnSO_4$	ohne Mn			mit Mn			Aktivierung %
	sofort mg	1 Std. mg	Spaltung %	sofort mg	1 Std. mg	Spaltung %	
M/100 1.0ccm	1.71	1.20	31	1.74	1.04	40	30
M/500 1.0 „	1.71	1.21	31	1.71	1.06	39	26
M/5000 1.0 „	1.72	1.23	29	1.71	1.13	35	21
M/50000 1.0 „	1.70	1.24	28	1.72	1.23	29	0

V. Einfluss der Salze auf die Arginasewirkung (PH 9.2).

M/10 Argininmonohydrochlorid	2.0 ccm
M/10 Natronlauge	1.0 „
Salzlösung	1.0 „
Wasser	2.0 „
M/10 Glykokollnatronpuffer	2.0 „
Fermentlösung	2.0 „

Tabelle V.

Salze		Arginin mg		Hydrolyse %
		sofort	1 Std.	
ohne $CaCl_2$		1.71	1.23	29
mit $CaCl_2$	M/100 1.0 ccm	1.69	1.22	30
	M/500 1.0 „	1.69	1.27	27
ohne $COCl_2$		1.74	1.21	30
mit $COCl_2$	M/30 1.0 „	1.71	1.26	28
	M/100 1.0 „	1.71	1.24	29
	M/500 1.0 „	1.70	1.21	30
ohne $NiSO_4$		1.72	1.25	28
mit $NiSO_4$	M/100 1.0 „	1.71	1.21	31
	M/500 1.0 „	1.71	1.25	28
ohne $MgSO_4$		1.72	1.26	28
mit $MgSO_4$	M/100 1.0 „	1.74	1.26	28
	M/500 1.0 „	1.72	1.20	31
	M/5000 1.0 „	1.69	1.24	29

ohne $CuSO_4$		1.71	1.28	27
mit $CuSO_4$	M/100 1.0 „	1.71	1.24	29
	M/500 1.0 „	1.68	1.20	31
	M/5000 1.0 „	1.74	1.22	30
ohne $FeSO_4$		1.70	1.23	29
mit $FeSO_4$	M/100 1.0 „	1.67	1.21	31
	M/500 1.0 „	1.70	1.20	31
	M/5000 1.0 „	1.72	1.25	28
ohne NaF		1.74	1.22	30
mit NaF	M/100 1.0 „	1.69	1.24	29
	M/500 1.0 „	1.69	1.26	28
ohne KCN		1.69	1.23	29
mit KCN	M/100 1.0 „	1.70	1.23	29
	M/500 1.0 „	1.70	1.27	27
ohne $K_4Fe(CN)_6$		1.74	1.26	28
mit $K_4Fe(CN)_6$	M/100 1.0 „	1.70	1.25	28
ohne $K_3Fe(CN)_6$		1.70	1.21	31
mit $K_3Fe(CN)_6$	M/100 1.0 „	1.69	1.25	28

VI. Vergleich der kolorimetrischen und Ureasemethode bei dem Arginasenachweis bei Ph 9.2 in den frischen Organen des Kaninchens.

M/10 Argininmonohydrochlorid	6.0 ccm
M/10 Natronlauge	3.0 „
Wasser	9.0 „
Glykokoll-Natronpuffer	6.0 „
Organsuspension	6.0 „

Kolorimetrische Argininbestimmung wurde wie oben erwähnt ausgeführt. Zur Ureasemethode wurde 10.0 ccm der Versuchslösung mit gleichem Volumen 5% Trichloressigsäure enteiweisst und 10.0 ccm Filtrat wurde durch Zusatz von 1.5 ccm *N*/10 Natronlauge neutralisiert, mit 4 ccm *M*/10 Phosphatpuffer (PH 7) und 4 ccm 2% Urease versetzt und bei 40° 1 Stunde stehen gelassen.

NH_3-Bestimmung durch Destillierungsmethode. Im Kontrollversuche wurde anstatt Argininhydrochlorid und Natronlauge 9.0 ccm Wasser gebraucht und die dabei durch Ureasemethode ermittelte NH_3-Menge wurde vom Hauptversuchsresultate abgezogen. Kolorimetrischer Argininnachweis verlief bei dem Kontrollversuch immer negativ.

Tabelle VI.

a) *Leber.*

	Sofort	1 Stunde		24 Stunden	
	Arginin mg	Arginin mg	Spaltung %	Arginin mg	Spaltung %
Kolorimetrie	1.71	0	100	0	100
Ureasemethode		0.01*	99	0.03*	98

b) *Niere.*

	Sofort	1 Stunde		24 Stunden	
	Arginin mg	Arginin mg	Spaltung %	Arginin mg	Spaltung %
Kolorimetrie	1.74	1.44	17	0	100
Ureasemethode		1.46*	16	0*	100

c) *Hoden.*

	Sofort	1 Stunde		24 Stunden	
	Arginin mg	Arginin mg	Spaltung %	Arginin mg	Spaltung %
Kolorimetrie	1.74	1.70	2	1.50	14
Ureasemethode		1.66*	4	1.46*	16

* Aus dem bemessenen NH_3 berechnete ungespaltene Argininmenge in 1.0 ccm enteiweissten Filtrats.

VII. Versuch bei Ph 9.2 über das Vorkommen der Arginase in verschieden Organen.

Tabelle VII.

	Kaninchen		Hund		Huhn	
	Argininspaltung %		Argininspaltung %		Argininspaltung %	
	1 Std.	24 Stdn.	1 Std.	24 Stdn.	1 Std.	24 Stdn.
Leber	100.0	100.0	100.0	100.0	2.0	10.5
Niere	22.1	100.0	5.5	29.8	29.7	100.0
Hoden	3.0	15.0	10.2	47.7	8.2	37.2
Muskel	2.0	1.0	1.0	1.0	0	2.0

VIII. Arginasewirkung der dialysierten Organautolysate bei Ph 9.2.

Tabelle VIII.

	Kaninchen		Hund		Huhn	
	Argininspaltung %		Argininspaltung %		Argininspaltung %	
	1 Std.	24 Stdn.	1 Std.	24 Stdn.	1 Std.	24 Stdn.
Leber	38.2	100.0	49.9	100.0	0	1.0
Niere	2.0	3.0	0	1.0	1.0	2.0
Hoden	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	0
Muskel	1.0	2.0	0	1.0	0	1.0

LITERATUR.

Bergmann, M. u. Zervas, L. (1927): Z. physiol. Chem., **172**, 277.
Edlbacher, S. u. Bonem, P. (1925) Z. physiol. Chem., **135**, 167.
Edlbacher, S. u. Röthler, H. (1925): Z. physiol. Chem., **148**, 273.
Edlbacher, S. u. Zeller, A. (1936): Z. physiol. Chem., **242**, 253.
Hellerman, L. u. Perkins, M. E. (1936): J. of Biol. Chem., **112**, 175.
Hunter, S. u. Morrell, T. A. (1933): Quart. J. exp. physiol., **23**, 89.
Kamiya, S. (1935): J. of Biochem., **22**, 263.

Kirian, W. u. Solowjew, L. (1935): Arch. biol. Nauk., **37**, 417. (Russisch).
„ „ (1936): Berich. gesam. Physiol. u. exp. Pharmak., **90**, 160.
Klein, G. u. Ziese, W. (1935): Klin. Wochenschr., **14**, 417.
„ „ (1935): Z. physiol. Chem., **235**, 246.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

ÜBER DIE PHOSPHORSÄUREVERESTERUNG IN ERYTHROCYTEN.

Von

KUMAKICHI YAMAMOTO.

(*Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.*)

(Eingegangen am 30. October 1936)

Uzawa (1932) hat früher berichtet, dass dem Phosphatasensystem 3 Arten Monoesterase angehören, die voneinander durch die Lage des PH-Optimum unterschieden werden können. Wenn in all diesen dialysierten Phosphatasenlösungen oder wenigstens in einer derselben die Reversibilität der Fermentwirkung nachweisbar wäre, so müsste eine vergleichende Untersuchung über das optimale PH der Synthese und der Hydrolyse zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung dieses Fermentes mehr oder weniger beitragen. Es gelang bei uns aber bisher niemand experimentell nachzuweisen, dass anorganisches Phosphat durch die dialysierten Monoesterasenlösungen bei verschiedenen PH sowohl mit Glycerin, als auch mit Zucker z.B. Glucose und Fruktose verestert werden kann. So sind wir jetzt der Meinung, dass es zum enzymatischen Phosphorsäureverestern eines anderen sich zugleich abspielenden chemischen Vorganges bedarf, der die bei der Synthese zu verbrauchende Energie liefert.

Um das Phosphorierungsproblem analytisch zu studieren, habe ich durch Anregung von Prof. Akamatsu mittelst Kaninchenerythrocyten die Bedingungen für die maximale Veresterung näher erforscht.

Rona und Iwasaki (1927) bestimmten den Phosphorsäureestergehalt der Blutkörperchen. Nach den Autoren ist die Zunahme der beim Stehenlassen der Erythrocyten frei werdenden anorganischen Phosphorsäure vom Zuckergehalt des Systems abhängig, sodass der Zuckerzusatz die Spaltung des Phosphorsäureesters

hemmt und das Gleichgewicht zugunsten der Synthese verschiebt. Sie konnten ferner feststellen, dass alle Faktoren, welche das Verestern ungünstig beeinflussen, der Glykolyse gegenüber auch einen ungünstigen Einfluss ausüben. Roche (1929) konnte im Verlauf der Blutglykolyse Verschiebung des anorganischen P-Werts nachweisen, indem er bei 29 von 42 Fällen eine Abnahme von 15–30%, bei 9 vielmehr eine Zunahme und in anderen keine quantitative Veränderung fand.

Es kann jetzt als sicher bewiesen gelten, dass der Zucker bei der Blutglykolyse wie beim Zuckerabbau in Muskel und in Hefe zuerst phosphoriert wird. Falls die Glykolyse in den Blutkörperchen erfolgt, so muss sich auch das Phosphatverestern in den Blutkörperchen abspielen. Aus diesem Grunde habe ich folgende Experimente an Hand der mit isotonischer Lösung gewaschenen Erythrocyten ausgeführt.

Bei dem Versuch der Phosphorierung muss man darauf achten, dass soweit die umkehrbare Reaktion Phosphorsäureester $\rightleftharpoons$ Phosphorsäure + Alkohol durch die Erythrocytenphosphatase katalysiert wird, zugleich mit der Synthese die Hydrolyse der entstandenen Zuckerphosphorsäure vonstatten geht, und dass währenddessen auch Dephosphorierung von phosphorhaltigen Zellbestandteilen parallel fortschreiten muss. Also ist es vorerst erforderlich, die Dephosphorierung dieser Erythrocytenbestandteile und den Wirkungsgrad der Blutkörperchenesterase zu erforschen.

Der Erythrocytensuspension, die aus defibriniertem Kaninchenblut, nach 3–4 maligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung auf das originale Blutvolumen isotonisch gefüllt, bereitet war, wurde eine gleiche Menge 0.85% NaCl zugesetzt, und darauf die Vermehrung des anorganischen Phosphats zeitlich verfolgt, wobei der Gehalt des anorganischen Phosphats mit der Zeit zunahm, und zwar nach 3 Stunden eine Zunahme von durchschnittlich 0.0356 mg pro 1 ccm der Probe, wenn auch individuell mehr oder weniger verschiedene Zunahme, beobachtet wurde. Andererseits wurde der Erythrocytensuspension ein gleiches Volumen $M/100$ Glycerophosphat in $M/7$ NaCl hinzugefügt und die Hydrolyse zeitlich näher studiert. Das hinzugefügte Glycerophosphat fiel

nach 3 Stunden im Mittel 27% der Hydrolyse anheim, eine Tatsache, die beweist, dass die Erythrocyten unter diesen Versuchsbedingungen eine mässig starke hydrolysierende Fähigkeit äusserten.

Da der Hydrolyse des Glycerophosphats das Eindringen dieses Substrates in die Blutkörperchen vorangehen muss, soll nun auf experimentellem Wege erforscht werden, wie die Diffusionsgeschwindigkeit in die Stromata den Hydrolysengrad beeinflusst.

Der Blutkörperchensuspension wurde einerseits ein gleiches Volumen des mit 0.85% NaCl isotonisch eingestellten $M/100$ Glycerophosphats zugesetzt, andererseits wurde sie mit $M/100$ Glycerophosphat vermischt und hämolysiert, die so erhaltenen beiden Proben wurden zu vergleichenden zeitlichen Untersuchungen der anorganischen Phosphorsäure herangezogen, wobei die Hydrolyse nach 3 Stunden bei der ersteren eine Vermehrung von durchschnittlich 27% und bei der letzteren eine von 36% aufwies, ein Beweis, dass das Glycerophosphat unter diesen Versuchsbedingungen leicht in die Stromata diffundieren kann.

Weiter wurden Einflüsse verschiedener Substanzen auf die Hydrolyse des Glycerophosphats in der Erythrocytenaufschwemmung und der hämolysierten Lösung näher erforscht. Ich konnte feststellen, dass Lecithin und Trypsin die Steigerung der Durchgängigkeit des Glycerophosphats verursacht. Dem Cholesterin und Phlorin kommt, wenn auch in kleinerem Grade, dieselbe Wirkung zu. Dagegen aber zeigte der Versuch mit der Suspension, welche derart hergestellt wurde, dass man Erythrocyten mit Tanninsäure zuerst behandelt und dann mit 0.85% NaCl wäscht, eine gewisse Herabsetzung der Diffundierbarkeit des Glycerophosphats. Natriumfluoid hemmt die Hydrolyse des Glycerophosphats sowohl in der Erythrocytensuspension als auch im hämolysierten Blut, während diejenige der Phosphorverbindungen der Blutkörperchenbestandteile gar nicht beeinflusst wird, was durch das Auftreten der gleichgradigen P-Vermehrung in der Erythrocytensuspension und in der hämolysierten Lösung sowohl mit als auch ohne Zusatz von Natriumfluorid nachgewiesen werden konnte.

Die Experimente zur Phosphorierung wurden alsdann ausge-

führt.

Zuerst habe ich den Einfluss der Konzentration der Komponente des Veresterungssystems, nämlich des Zuckers und Phosphats, auf den Synthesekoeffizient untersucht. Phosphorhaltige Verbindungen in Blutkörperchen werden, wie oben beschrieben, im Laufe der Zeit hydrolysiert. Bei Berechnung der Synthese habe ich aber diese Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure bequemlichkeitshalber nicht in Betracht gezogen und den Veresterungsgrad bloss aus dem verminderten Gehalt des zugesetzten anorganischen Phosphats errechnet.

Vorest wurde $2M/7$ Glucoselösung welche K_2HPO_4 in $M/10$, $M/20$, $M/50$, resp. $M/100$ enthielt, zubereitet. Dann wurde jeder Lösung eine gleiche Menge der Blutkörperchenaufschwemmung zugesetzt und den anorganischen Phosphor zeitlich bestimmt, wobei seine prozentuelle Verminderung bei einer grossen Konzentration des Phosphats am geringsten und bei derjenigen von $M/100$ am grössten festgestellt wurde. Daher habe ich bei den folgenden Versuchen, um die Beeinflussbarkeit des Phosphorierungsgrades unter variierenden Bedingungen möglichst deutlich zu beobachten, die zuzusetzende P-Menge meistenfalls als $M/100$ Endkonzentration bestimmt.

Falls bei derselben Phosphatkonzentration die Glucosemenge des Systems vermindert wird, nämlich $2M/7$ Glukose in $M/100$ Phosphat mit $M/7$ NaCl in $M/100$ Phosphat 2, 4 resp. 10 fach verdünnt und jeder der so hergestellten Lösungen ein gleiches Volumen Blutkörperchensuspension hinzugefügt wurde, dann war der Veresterungsprozentsatz bei verminderter Glucose beträchtlich klein. Daraus ist ersichtlich, dass der hohe Phosphorierungsgrad bei grossem Zuckergehalt zu verwirklichen ist.

Weiter wurde der $2M/7$ Fruktose in $M/100$ Phosphatlösung gleiche resp. 2 oder 4 fache Menge der Blutkörperchenaufschwemmung hinzugefügt und die Synthese vergleichend untersucht. In dem letzteren Fall wurde keine Verminderung des anorganischen Phosphors zum Nachweis gebracht. Es soll so erklärt werden, dass die veresterte P-Menge gerade durch die P-Abspaltung aus dem Blutkörperchenbestandteile kompensiert wurde. Wenn man aber

diese abgespaltene P-Menge in Rechnung zieht und ausserdem voraussetzt, dass diese Hydrolyse unabhängig von der Synthese des Zuckerphosphats vor sich geht, so ergibt es sich, dass je grösser die Blutkörperchenzahl ist umso weiter schreitet die Phosphorierung fort. Da zur experimentellen Bestätigung der Phosphorierung der Nachweis der P-Verminderung in dem System praktisch vorteilhaft ist, so ist der Zusatz eines gleichen Volumens $2M/7$ Zucker in $M/100$ Phosphat zur oben genannten Blutkörperchensuspension als geeignet zu erwähnen.

Wenn dieses Phosphorierungssystem weiter mit seinem ½ oder 1½ Volumen 0.85%iger Kochsalzlösung verdünnt wird, so erfährt der Synthesengrad eine Abnahme. Die Verdünnung des Systems verursacht also wirkliche Verminderung der Phosphorierung, obwohl die relative Konzentration der an der Reaktion teilnehmenden Komponente damit nicht verändert wird.

Alsdann wurden vergleichende Versuche der Phosphorierung verschiedener Zuckerarten angestellt, wobei Glucose, Fruktose und vor allem Mannose in weitem Grade Verminderung des anorganischen Phosphors zeigte, während mit Galaktose keine Phosphorierung, sondern eine Vermehrung des anorganischen Phosphors nachgewiesen wurde, was der Dephosphorierung der Blutkörperchenkomponente zuzuschreiben sein könnte. Rohrzucker, Maltose und Laktose wurden ebenfalls nicht verestert. Auf diese Weise gelang es mir nachzuweisen, dass bloss glykolysierbare Zuckerarten der Synthese anheim fallen können.

Nächstdem wurden die Bedingungen, welche die Phosphorierung quantitativ in die Höhe zu bringen imstande sind, näher studiert.

Im Thermostat von 37° wurde das Phosphorierungssystem aus gleichen Volumina von Erythrocytensuspension und $2M/7$ Glucose in $M/100$ Phosphat ultraviolett bestrahlt, wobei keine Phosphorierung, sondern eine Vermehrung des anorganischen Phosphors auftrat. Ferner wurde durch das System während des Versuchs Stickstoff oder Sauerstoff geleitet. Die Sättigung mit Stickstoff übte keine merkliche Beeinflussung aus, was darauf hindeutet, dass die zur Synthese Energie liefernde Reaktion anoxybiontisch ver-

laufen kann. Bei der Sauerstoffeinleitung zeigte sich vielmehr eine Verminderung des Synthesekoeffizienten. Der Einfluss des Insulins und Adrenalins wurde dann wie folgt untersucht. Aus dem 2 Stunden nach Insulin- oder Adrenalininjektion entnommenen Blut wurden die Blutkörperchen zubereitet und ein vergleichender Versuch mit denjenigen vor der Hormoninjektion angestellt. Nach Insulininjektion konnte man eine geringe Zunahme der Synthese konstatieren, während die Adrenalininjektion vielmehr Neigung zur Vermehrung des anorganischen Phosphors erzeugte. In bezug auf die Einflüsse der verschiedenen organischen und anorganischen Salze auf die Phosphorierung konnte ich bei Zusatz von $M/100$ Kalium Carbonat und Guanidin Carbonat eine leichte Vermehrung der Synthese feststellen, andere Substanzen, unter denen Adenosintriphosphat, Fruktosediphosphat, Pyruvinat, Monojodacetat, Acetaldehyd, Magnesiumchlorid, Arginin, Kreatin u.s.w. aufzuzählen sind, übten fast keinen Einfluss aus oder es konnte sogar eine Vermehrung des anorganischen Phosphors nachgewiesen werden.

Bei den oben erwähnten Versuchen wurden Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in derselben aufgeschwemmt.

Um Natriumchlorid mit anderen Salzen auszutauschen, habe ich als Waschflüssigkeit und suspendierende Lösung Kaliumchlorid, Kaliumcitrat resp. Ammoniumcitrat gebraucht. Bei Kaliumchlorid war im Vergleich mit dem Fall von Kochsalzbehandelung keine merkliche Differenz vorhanden, aber bei Kaliumcitrat und noch ausgeprägter bei Ammoniumcitrat wurde eine Vermehrung des Phosphorierungsprozentsatzes beobachtet.

Begünstigender Einfluss von Ammoniumion auf die Synthese war unübersichtlich gross, was auch bei dem weiteren Versuch mit Kaliumsulfat und Ammoniumsulfat noch deutlicher zum Vorschein kam. Ob diese Ammoniumwirkung bei der Phosphorierung irgendeinen Zusammenhang mit der wohlbekannten Desaminierung der Adenylsäure habe, soll zukünftig untersucht werden. Sowohl Citrat als auch Sulfat gehört zu den kalkfällenden Mitteln, aber dass es hier nicht um Entionisierung des Calcium sich handelt, ist daraus ersichtlich, dass die Behandelung der Blutzellen mit Kalium-

oxalat in gleicher Weise keine Verminderung sondern sogar Vermehrung des anorganischen Phosphats verursachte.

Unter den obigen Experimenten zeigte das System, in welchem der mit Ammoniumsulfat zubereiteten Blutkörperchensuspension ein gleiches Volumen von $2M/7$ Zucker in $M/100$ Kaliumphosphat zugesetzt worden war, die grösste Phosphorierung.

Als in diesem System anstatt von $M/100$ Kaliumphosphat $M/100$ Ammoniumphosphat und zwar $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, resp. $(NH_4)_3PO_4$ zur Verwendung kam, konnte ausser dem Einfluss der Azidität des Medium noch eine stark gesteigerte Synthese beobachtet werden. Mit $(NH_4)_3PO_4$ wurde nach 4 Stunden eine 78%ige Phosphorierung festgestellt.

Hier ist es auch erforderlich zu erforschen, ob nach dem Waschen mit Ammoniumsulfat eine Verminderung der dephosphorierbaren Substanzen in Blutkörperchen stattgefunden hatte oder ob das Sulfat eine verminderte Dephosphorierung jener Substanzen verursachte. Das Experiment ergab, dass Erythrocyten, in physiologischer Kochsalzlösung oder in isotonischer Ammoniumsulfatlösung aufgeschwemmt, sowohl die P-haltigen Zellbestandteile als auch zugesetztes $M/100$ Glycerophosphat in $M/7$ NaCl in gleichem Grad aufzuspalten imstande waren.

Als die Phosphorierung verschiedener Zuckerarten mit den in Ammoniumsulfat suspendierten Erythrocyten und zugleich vergleichend mit denselben in Kochsalzlösung untersucht wurde, kam ich zum Resultat, dass die Synthese bei Glucose und Fruktose in stark erhöhtem Mass vonstatten ging, während Verestern der Mannose mehr oder weniger beeinträchtigt wurde. Galaktose und Maltose konnten auch nicht phosphoriert werden.

Wenn die Blutkörperchen in dem obenerwähnten System anorganischen Phosphor zur gebundenen Form führen können, so muss das veresterte Phosphat entweder in den Zellen bleiben oder durch Stromata hindurch in die äussere Lösung gelangen. Um dieses zu entscheiden, wurde folgenderweise experimentiert. Von dem obenangeführten Phosphorierungssystem und von dem Gemisch aus derjenigen Blutkörperchensuspension + gleichem Volumen $M/100$ Phosphat in $M/7$ NaCl wurde je ein Teil sogleich und nach

3 Stunden zentrifugiert und der so erhaltene Abguss wurde auf den Gehalt anorganischen wie gesamten Phosphors untersucht. Im Phosphorierungssystem wurde ausser deutlicher Abnahme des anorganischen P-Gehalts noch beobachtet, dass der nach 3 Stunden gefundene anorganische Phosphor dem gleichzeitig vorhandenen Gesamt-P fast nahe lag, während bei Abwesenheit von Zucker der anorganische Phosphor in der Aussenflüssigkeit in derselben Zeitdauer fast unverändert blieb, was vielleicht damit erklärt werden kann, dass der aus Zellbestandteilen abgespaltene P das Eindringen des Phosphats verhindert. Immerhin war die veresterte Phosphorsäure ausschliesslich in den Blutkörperchen zugegen. Es ist bemerkenswert, dass das Glycerophosphat ganz leicht durch die Stromata diffundiert, dagegen die in den Zellen aus dem Zucker und Phosphat gebildeten Phosphorverbindungen in den Blutkörperchen bewahrt blieben.

Bei diesen synthetisierten P-Verbindungen handelt es sich allerhöchstens um Hexosephosphat, weil in dem Phosphorierungssystem keine deutliche Zunahme von nach Meyerhof und Lohmann (1934) alkaliverseifbarem P nachweisbar war und in Trichloressigfiltrat von 3 stündiger Probe keine Brenztraubensäure durch Dinitrophenylhydrazin (Neuberg, 1931) gefällt wurde und daher die Glykolyse als über die Hexosephosphatbildung nicht fortgeschritten anzunehmen ist.

Experimenteller Teil.

1. *Zubereitung der Blutkörperchenaufschwemmung.*

Das durch Herzpunktion entnommene Kaninchenblut wird defibriniert, der Abguss weggegossen, Erythrocyten mit physiologischer Kochsalzlösung 3 4 mal gewaschen, dann mit der betreffender Flüssigkeit zum Originalvolumen aufgefüllt.

Wie oben erwähnt, wurde je nach dem Zweck statt der physiologischen Kochsalzlösung $M/7$ KCl, $2M/7 \times 3$ Kaliumoxalat, $M/7 \times 2$ Kaliumcitrat, $M/7 \times 2$ Ammoniumcitrat, $2M/7 \times 3$ Kaliumsulfat oder $2M/7 \times 3$ Ammoniumsulfat gebraucht. $M/7 \times 2$ Kaliumcitrat stellt man so her, dass $M/7$ Citronensäure mit gleichem

Volumen $3M/7$ Kalilauge gemischt wird. $M/7 \times 2$ Ammoniumcitrat wird so bereitet, dass ein bestimmtes Volumen $M/7$ Citronensäure nach Neutralisieren mit Ammoniak auf das doppelte Volumen mit Wasser verdünnt wird. $2M/7 \times 3$ Ammoniumsulfat wird bei Herstellung durch Ammoniakzusatz gegen Lackmus neutralisiert.

2. Die isotonische Glycerophosphatlösung war M/100 Natrium Glycerophosphat gelöst in M/7 NaCl.

Zum Hydrolyseversuche des Glycerophosphats wird Blutkörperchensuspension mit gleichem Volumen von a) $M/7$ NaCl oder b) $M/100$ Glycerophosphat in $M/7$ NaCl versetzt. Bei der Glycerophosphathydrolyse durch Hämolysat werden die Versuche so angestellt, dass der Blutzellensuspension gleiches Volumen von a′) Wasser und b′) $M/100$ Glycerophosphat zugesetzt wird, wobei die Auflösung der Erythrocyten sofort stattfindet. Jede Lösung wird im Thermostat bei 37° gehalten und davon wird eine bestimmte Menge sofort, nach 1, 2 resp. 3 Stunden herausgenommenen und mit gleichem Volumen 16% Trichloressigsäure vermischt, 5 ccm Filtrat wird zur Bestimmung des anorganischen Phosphors herangezogen. b)–a) stellt den Wert des Glycerophosphats dar, welche durch die Phosphatase der Hydrolyse anheim fällt.

3. Isotonische Phosphat-Zuckerlösung.

$M/100$ K_2HPO_4-Lösung wird zuerst zubereitet, um dann damit $2M/7$ Zuckerlösung herzustellen. Dazu wird der Ausdruck $M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Zucker gebraucht. Der Versuch zur Phosphorierung wird wie folgt ausgeführt. Man mischt Blutkörperchensuspension mit gleichem Volumen isotonischer Phosphat-Zuckerlösung und stellt sie in Thermostat bei 37°. 1 ccm davon wird sofort, nach 1, 2, resp. 3 Stunden herausgenommen, mit 0.05% NaF 5 fach verdünnt, mit gleichem Volumen 16% Trichloressigsäure enteiweisst, und dann wird 5 ccm Filtrat zur Bestimmung des anorganischen Phosphors verwendet.

Bei dem Citrat oder Oxalat enthaltenden System war die P-Bestimmung nach Fiske und Subbarow wegen der verzögerten Farbentwickelung nicht ausführbar. Daher wurde dabei Young-

burgsche Methode angewandt, aber selbst dadurch ergab die P-Bestimmung an der sogleich nach Anstellung der Citrat- oder Oxalatversuch entnommenen Probe noch eine etwa um 10% geringere Menge als der zugesetzte Phosphor. Jene P-Zahl wurde jedoch willkürlich als Anfangswert zur Berechnung der Phosphorierungsgrades gebraucht, ohne in das Wesen des herabgesetzten P-Nachweises einzugehen.

Bei dem Experimente an Hand der Einflüsse verschiedener Substanzen auf Glycerophosphathydrolyse und Phosphatveresterung wurden gewaschene Erythrocyten mit 1% Lecithin, 1% Trypsin, 1% Cholesterin, $M/100$ Monojodacetat, $M/100$ Kaliumcarbonat, $M/100$ Guanidincarbonat, $M/100$ Brenztraubensauresnatrium, $M/100$ Fruktosephosphat oder 0.5% Acetaldehyd je in physiologischer Kochsalzlösung bis zum Originalvolumen aufgefüllt und dann das gleiche Volumen $M/100$ Glycerophosphat in $M/7$ NaCl oder $2M/7$ Zucker in $M/100$ K_2HPO_4 zugesetzt und wie oben beschrieben zeitlich behandelt, um den anorganischen Phosphor zu bestimmen.

Phlorin, Arginin und Kreatin wurden je 5 mg und Adenosintriphosphat 1 mg auf 1 ccm Blutkörperchensuspension hinzugesetzt, während bei anderen die Phosphorierungsversuche so ausgeführt wurden, dass 1 Tropfen 4% NaF, 10% $CaCl_2$ oder 10% $MgCl_2$ zum Phosphorierungssystem zugesetzt wurde.

Beim Versuch mit Tannin vermischt man 0.1% neutralisierter Tanninlösung mit gleichem Volumen 1.7% NaCl, fügt der so hergestellten Lösung ein fast gleiches Volumen der Blutkörperchensuspension hinzu, lässt das Ganze einige Minuten stehen und zentrifugiert. Der Bodensatz wird dann mit physiologischer NaCl-Lösung bis zur Menge der originalen Blutkörperchenaufschwemmung aufgefüllt.

Bestrahlung mit künstlicher Höhensonne wird im Thermostat bei 37° in der Entfernung von etwa 30–40 ccm ausgeführt.

Insulininjektion 2.5 Einheiten pro kg und Adrenalinchlorhydrat 0.3 ccm 1:1000 pro kg.

Die Zahlen in der Tabelle zeigen den gefundenen P in mg pro 1 ccm der Versuchslösung, das hydrolytische Prozent des Glycero-

phosphats und das Veresterungsprozent, das, wie oben erwähnt, ohne Berücksichtigung der Dephosphorierung der Zellbestandteile einfachheitshalber aus der Abnahme des zugesetzten Phosphats berechnet wird.

I. Versuch zur Hydrolyse.

A. Hydrolyse des Glycerophosphats in Erythrocytenaufschwemmung und ihre Beeinflussung durch verschiedene Zusätze.

a. A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm $M/7$ NaCl.
b. A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm $M/100$ Glycerophosphat in $M/7$ NaCl.
c. A ccm Blutkörperchensuspension mit Zusatz + A ccm Glycerophosphat in $M/7$ NaCl.

Stunden	a	b		c (Lecithin)	
	P	P	%	P	%
0	0.010	0.010		0.010	
1	0.028	0.044		0.070	
2	0.042	0.078		0.103	
3	0.050	0.090	25.6	0.121	45.8

Stunden	a	b		c (Trypsin)	
	P	P	%	P	%
0	0.009	0.008		0.008	
1	0.015	0.032		0.052	
2	0.022	0.058		0.080	
3	0.032	0.076	28	0.110	43

Stunden	a	b		c (Cholesterin)	
	P	P	%	P	%
0	0.008	0.008		0.006	
1	0.022	0.046		0.050	
2	0.037	0.072		0.080	
3	0.046	0.098	33	0.106	38.7

Stunden	a	b		c (Phlorin)	
	P	P	%	P	%
0	0.004	0.004		0.004	
1	0.021	0.047		0.048	
2	0.034	0.072		0.078	
3	0.046	0.086	26	0.102	36

Stunden	a	b		c (Tanninsäure)	
	P	P	%	P	%
0	0.008	0.007		0.007	
1	0.018	0.027		0.032	
2	0.028	0.052		0.043	
3	0.039	0.080	26.5	0.067	18

B. Hydrolyse des Glycerophosphats in hämolysierter Lösung und ihre Beeinflussung durch verschiedene Zusätze.

a'. A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm H_2O.
b'. A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm $M/100$ Glycerophosphat.
c'. A ccm Blutkörperchensuspension mit Zusatz + A ccm $M/100$ Glycerophosphat.

Stunden	a'	b'		c' (Lecithin)	
	P	P	%	P	%
0	0.008	0.008		0.008	
1	0.028	0.057		0.054	
2	0.032	0.074		0.072	
3	0.036	0.090	34 8	0.085	31.6

Stunden	a'	b'		c' (Trypsin)	
	P	P	%	P	%
0	0.008	0.008		0.010	
1	0.017	0.041		0.041	
2	0.019	0.062		0.060	
3	0.026	0.072	29.6	0.061	22.6

Stunden	a′	b′		c′ (Cholesterin)	
	P	P	%	P	%
0	0.008	0.008		0.008	
1	0.017	0.041		0.035	
2	0.019	0.062		0.057	
3	0.026	0.072	29.6	0.068	27.0

Stunden	a′	b′		c′ (Phlorin)	
	P	P	%	P	%
0	0.010	0.010		0.009	
1	0.017	0.048		0.047	
2	0.021	0.065		0.068	
3	0.023	0.076	34	0.078	35.5

Stunden	a′	b′		c′ (Tanninsäure)	
	P	P	%	P	%
0	0.008	0.008		0.009	
1	0.028	0.057		0.052	
2	0.032	0.074		0.070	
3	0.036	0.090	34.8	0.085	31.6

C. P-Abspaltung aus Erythrocytenbestandteil unter verschiedenen Bedingungen.

a. A ccm Blutkörperchensuspension + 2 A ccm $M/7$ NaCl.
b. A ccm Blutkörperchensuspension + 2 A ccm H_2O.
c. A ccm Blutkörperchensuspension + 2 A ccm 0.05% NaF.

Stunden	a	b	c
0	0.003	0.003	0.004
1	0.011	0.012	0.012
2	0.023	0.026	0.023
3	0.034	0.035	0.034

II. Versuche zur Phosphorierung.

A. Beeinflussung durch die variierende Konzentration der Komponente des Veresterungssystems.

1. Einfluss der Zuckerkonzentration auf die Phosphorierung. Man verdünnt $M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Glukose mit $M/100$

K_2HPO_4 in $M/7$ NaCl auf 2, 4 oder 10 fach. Die Lösung wird mit gleichem Volumen Blutkörperchensuspension gemischt.

a. Versuch mit Erythrocyten, die mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen und in derselben aufgeschwemmt sind.

Phosphat-zucker	Unverdünnt		2 fache Verdünnung		4 fache Verdünnung		10 fache Verdünnung	
Stunden	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.154		0.154		0.152		0.152	
1	0.133		0.141		0.147		0.147	
2	0.126		0.139		0.141		0.145	
3	0.122	19.7	0.136	11.7	0.138	9.0	0.145	5.0

b. Versuch mit Erythrocyten, die in gleicher Weise wie bei a) mit isotonischem Kaliumsulfat behandelt worden sind.

Phosphat-zucker	Unverdünnt		2 fache Verdünnnug		4 fache Verdünnung		10 fache Verdünnung	
Stunden	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.154		0.154		0.150		0.150	
1	0.124		0.130		0.133		0.136	
2	0.106		0.114		0.122		0.130	
3	0.100	35	0.109	29	0.113	24.7	0.123	18.0

c. Versuch mit Erythrocyten, die in gleicher Weise wie bei a) mit isotonischem Ammoniumsulfat behandelt worden sind.

Phosphat-zucker	Unverdünnt		2 fache Verdünnung		4 fache Verdünnung		10 fache Verdünnung	
Stunden	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.150		0.150		0.149		0.150	
1	0.128		0.130		0.128		0.130	
2	0.114		0.117		0.114		0.119	
3	0.093	38	0.103	31	0.103	31	0.109	27

2. Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Phosphorierung unter Gleichhaltung von Erythrocyten- und Zuckermenge.

A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm (K_2HPO_4 in $2M/7$ Glukose)

K_2HPO_4	$M/10$		$M/20$		$M/50$		$M/100$	
Stunden	P	%	P	%	P	%	P	%
0	1.554		0.777		0.311		0.155	
1	1.454		0.727		0.291		0.140	
2	1.454		0.734		0.269		0.129	
3	1.454	6	0.733	6	0.273	12	0.129	16.8

3. Einfluss der Verdünnung des Phosphorierungssystems.

a. A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose).

b. A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose) + A ccm $M/7$ NaCl.

c. A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose) + 3A ccm $M/7$ NaCl.

Stunden	a		b		c	
	P	%	P	%	P	%
0	0.152		0.099		0.059	
1	0.142		0.098		0.062	
2	0.136		0.099		0.058	
3	0.136	10.5	0.097	2.0	0.060	0

4. Einfluss der Konzentration der Blutkörperchensuspension.

a′. A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose).

b′. 2A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose).

c′. 4A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose).

Stunden	a′		b′		c′	
	P	%	P	%	P	%
0	0.152		0.102		0.063	
1	0.144		0.101		0.067	
2	0.141		0.102		0.070	
3	0.136	10.5	0.101	0	0.070	<0

B. Phosphorierung unter verschiedenen Zusätzen.

1. *N_2 oder O_2 Durchleitung und Phosphorierung.*

a. A ccm Blutkörperchensuspension
+A ccm($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Glukose).
b. Derselbe Ansatz unter N_2 Durchleitung.
c. „ „ „ O_2 „ .

Stunden	a		b		c	
	P	%	P	%	P	%
0	0.158		0.158		0.158	
1	0.141		0.149		0.137	
2	0.129		0.133		0.138	
3	0.133	15.8	0.135	14.6	0.141	10.7

2. *Einfluss der Hormoninjektion auf Phosphorierung.*

A ccm Blutkörperchensuspension
+A ccm($M/100$ K_2HPO_2 in $2M/7$ Fruktose).

Stunden	Insulin				Adrenalin			
	Vor d. Injektion		2 Stdn. nach d. Injektion		Vor d. Injektion		2 Stdn. nach d. Injektion.	
	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.160		0.156		0.154		0.155	
1	0.152		0.147		0.152		0.152	
2	0.148		0.141		0.150		0.152	
3	0.148	7.5	0.141	9.6	0.142	8.9	0.156	0

3. *Versuche über den Einfluss der verschiedenen Salze auf die Phosphorierung.*

a. A ccm Blutkörperchensuspension
+A ccm($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Glucose).
b. A ccm Blutkörperchensuspension mit Zusatz
+A ccm($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Glucose).

Stunden	Cholesterin				Lecithin				Trypsin			
	a		b		a		b		a		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.155		0.155		0.157		0.156		0.152		0.154	
1	0.145		0.158		0.158		0.156		0.144		0.166	
2	0.142		0.154		0.143		0.156		0.143		0.178	
3	0.145	6.5	0.155	0	0.140	10.8	0.155	0	0.141	7	0.180	<0

Stunden	Phlorin				Arginin				Kreatin			
	a		b		a		b		a		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.154		0.161		0.160		0.160		0.156		0.156	
1	0.149		0.149		0.147		0.157		0.142		0.148	
2	0.143		0.142		0.145		0.151		0.143		0.154	
3	0.141	8.4	0.151	6	0.142	11	0.147	8	0.141	9.6	0.149	4.5

Stunden	Monojodoessigsäure				Fruktosephosphorsaures Calcium				Brenztraubensaures Natrium			
	a		b		a		b		a		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.156		0.156		0.157		0.157		0.156		0.150	
1	0.146		0.164		0.140		0.145		0.137		0.148	
2	0.146		0.168		0.133		0.145		0.135		0·148	
3	0.142	9	0.172	<0	0.133	15	0.153	2.5	0.133	14.7	0.150	0

Stunden	Ammonium Carbonat				Kalium Carbonat				Guanidin Carbonat	
	a		b		a		b		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.150		0.149		0.154		0.150		0.150	
1	0.143		0.141		0.141		0.140		0.137	
2	0.141		0.135		0.127		0.122		0.114	
3	0.137	8.6	0.132	11.4	0.127	17.5	0.120	20	0.115	23

Stunden			Acetaldehyd.	
	a		b	
	P	%	P	%
0	0.157		0.156	
1	0.136		0.156	
2	0.135		0.152	
3	0.140	10.8	0.158	0

Stunden			$MgCl_2$		$CaCl_2$		NaF	
	a		b		b		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.156		0.152		0.158		0.152	
1	0.144		0.147		0.162		0.149	
2	0.144		0.149		0.166		0.150	
3	0.140	10	0.142	6.5	0.168	<0	0.149	2

C. Phosphorierung durch Erythrocyten, die mit verschiedener isotonischer Salzlösung gewaschen und in derselben aufgeschwemmt sind.

A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Glukose).

Stunden	NaCl		Kaliumsulfat		Ammoniumsulfat	
	P	%	P	%	P	%
0	0.150		0.150		0.149	
1	0.133		0.120		0.123	
2	0.125		0.102		0.104	
3	0.123		0.088		0.088	
4	0.125	16.7	0.083	44.7	0.073	50.0

Stunden	NaCl		Kalium Oxalat		Kalium Citrat		Ammonium Citrat	
	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.150		0.140		0.138		0.141	
1	0.137		0.142		0.123		0.122	
2	0.129		0.151		0.117		0.110	
3	0.131	12.7	0.157	<0	0.114	17.3	0.096	32

D. Phosphorierungsversuch mit Ammoniumphosphat. Erythrocyten werden in isotonischem Ammoniumsulfat suspendiert.

A ccm Blutkörperchensuspension
+A ccm ($M/100$ Ammoniumphosphat in $2M/7$ Fruktose).

Stunden	$(NH_4)H_2PO_4$		$(NH_4)_2HPO_4$		$(NH_4)_3PO_4$	
	P	%	P	%	P	%
0	0.152		0.153		0.154	
1	0.111		0.102		0.107	
2	0.090		0.070		0.068	
3	0.088		0.054		0.043	
4	0.089	41.4	0.054	64.7	0.034	77.9

E. Versuche zur Phosphorierung der verschiedenen Zuckerarten.

A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Zucker).

a. Blutkörperchensuspension in physiologischer Kochsalzlösung.

b. Blutkörperchensuspension in isotonischem Ammoniumsulfat.

Stunden	Fruktose				Mannose			
	a		b		a		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.150		0.149		0.149		0.149	
1	0.138		0.119		0.133		0.139	
2	0.133		0.081		0.122		0.133	
3	0.133		0.061		0.115		0.135	
4	0.137	8.6	0.046	69	0.115	22.8	0.135	9.0

Stunden	Glukose				Galaktose			
	a		b		a		P	
	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.152		0.150		0.150		0.150	
1	0.136		0.126		0.150		0.155	
2	0.126		0.103		0.153		0.160	
3	0.126		0.086		0.160		0.160	
4	0.126	17	0.073	51	0.162	<0	0.162	<0

Stunden	Maltose				Laktose			
	a		b		a		b	
	P	%	P	%	P	%	P	%
0	0.150		0.148		0.152		0.150	
1	0.145		0.140		0.150		0.144	
2	0.156		0.150		0.166		0.160	
3	0.156		0.145		0.162		0.160	
4	0.150	0	0.148	0	0.157	<0	0.150	0

F. Vergleichende Versuche zur Glycerophosphat-Hydrolyse durch Erythrocyten, die in physiologischer Kochsalzlösung oder isotonischem Ammoniumsulfat suspendiert sind.

a, a′. A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm M/7 NaCl.
b, b′. A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm (M/100 Glycerophosphat in M/7 NaCl).

Stunden	NaCl			Ammoniumsulfat		
	a	b		a′	b′	
	P	P	%	P	P	%
0	0.002	0.002		0.002	0.002	
1	0.014	0.029		0.012	0.027	
2	0.025	0.053		0.023	0.049	
3	0.036	0.067	20.0	0.029	0.061	20.6

G. P in Zentrifugat des Phosphorierungssystems.

A) A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm (M/100 K_2HPO_4 in M/7 NaCl).
B) A ccm Blutkörperchensuspension
+ A ccm (M/100 K_2HPO_4 in 2M/7 Fruktose).

Stunden	(A)			(B)		
	Gesamt-P.	Anorg.-P.	Org.-P.	Gesamt-P.	Anorg.-P.	Org.-P.
0		0.200			0.180	
3	0.200	0.193	0.007	0.081	0.069	0.012

H. Bestimmung des Alkaliverseifbaren P.

A ccm Blutkörperchensuspension + A ccm ($M/100$ K_2HPO_4 in $2M/7$ Fruktose)

A) Versuch mit Blutkörperchensuspension in isotonischem Ammoniumsulfat.

Stunden	Anorg.-P.	Anorg.-P. + Alkaliverseifb. P.	Alkaliverseifb. P.
0	0.157	0.160	0.003
3	0.052	0.070	0.018

B) Versuch mit Blutkörperchensuspension in physiologischem NaCl.

Stunden	Anorg.-P.	Anorg.-P. + Alkaliverseifb. P.	Alkaliverseifb. P.
0	0.150	0.150	0
3	0.131	0.138	0.007

LITERATUR.

Meyerhof, O. u. Lohmann, K. (1934): Biochem. Zeitschr., **271**, 91.
Neuberg, C. u. Simon, E. (1931): Biochem. Zeitschr., **232**, 479.
Roche, A. u. Roche, J. (1929): Bull. Soc. Chem. Biol., **11**, 549.
Rona, P. u. Iwasaki, K. (1927): Biochem. Zeitschr., **184**, 318.
Uzawa, S. (1932): J. of Biochem., **15**, 19.

The Journal of Biochemistry, Vol. 24, No. 3.

THE EFFECT OF ADRENALECTOMY ON THE CHOLESTEROL CONTENTS OF TISSUES AND ORGANS.

By

SHUN-ICHI YASUE.

(*From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University, Director: Prof. Samuro Kakiuchi.*)

(Received for publication, October 30, 1936)

I. Introductory.

In 1913 Grigaut reported that one sided adrenalectomy caused a hypercholesterolemia after a certain latent stadium, the maximum of which was attaining at the 12th day and returning after 3 weeks to the normal value. One remaining adrenal gland showed a hypertrophia. M. A. Rothschild (1915) proved his result and found also that the cholesterol content of the remaining adrenal body, although decreased at first, began to increase when the hypercholesterolemia attained a certain degree. His bilateral adrenalectomia in rabbit caused a larger change than the one sided operation. Parallel with hypercholesterolemia, cholesterol content in liver was increased sooner or later, and when hypercholesterolemia was more prolonged the cholesterol was excreted into the bile in a large amount. Later, however, Baumann and Holly (1923) reported that in both unilateral and bilateral adrenalectomy of rabbit cholesterol content of blood remained normal.

Hartmann (1927) observed in bilateral adrenalectomized cat the hyperemia of kidney parenchym with a plentiful of granula in epithelium, these granula being stained by sudan III or nile blue sulphate. Handovsky and Tamman (1928) found that bilateral adrenalectomy in rabbit caused a decrease in cholesterol content both in liver and muscle, and emphasized that they were unable to verify the Rothschilds' description. They found also that under the microscope, the kidney showed an unusual amount of liqoid granula, and they thought lipoid might be excreted through kidney. Lucas

(1926) found no appreciable change in blood cholesterol content after bilateral adrenalectomy in dog, and ascribed a small increase in blood cholesterol to the anhydrenemia due to the adrenalectomy. Reiss (1930) found that the intravenous injection of cortin into the bilaterally adrenalectomized rabbits had the effect of lowering of blood cholesterol content into the normal level of unadrenalectomized rabbit. Thaddea and Fasshauer (1936) reported that bilateral adrenalectomy caused the death of cats within 3–5 days after the operation. Cholesterol in serum, especially that of ester form, is increased, while in liver and muscle it is decreased. By cortin injection these increase or decrease returned to normal level. Cortin injections into normal dogs caused also a decrease of serum cholesterol, especially that of ester cholesterol. The blockage of reticuloendotherial system by Indian ink injection, prevented the decrease of serum cholesterol content after the intravenous injection of cortical hormone. In bilaterally adrenalectomized cat, they were unable to observe hypercholesterolemia after the cholesterol digestion.

Since 1930 I have tried to follow the change of cholesterol content in various tissues after bilateral adrenalectomy and the effect of the injection of cortical hormone to the adrenalectomized animal. In the following, the results of my experiment are given.

II. Animal.

Male cats weighing 2500–3000 gm. were rationed daily with 150 gm. rice, 300 gm. fish and 40 gm. miso (a product obtained by the action of aspergillus oryzae on salted soy bean), for about 1–2 weeks. The determination of cholesterol content of normal cats were made on these animals.

For the suprarenalectomy the animal was fasted for 24 hours and operated under ether narcosis.

For the extirpation experiment of the adrenal gland a cat was used, as this animal is free from the accessory adrenal glands. The extirpation was carried out at one session. The animal was fixed in a dorsal position, narcotised with chlorethyl at firts and narcosis continued with ether. Parallel with and about 5 cm

lateral to the backbone, a skin incision was made, and dissecting carefully with the spatula without opening the peritoneal cavity, the suprarenal body was easily isolated and removed. When one suprarenal body was removed, the other one was also removed successively at one session. After ligation the wound was covered with bandage. After the operation animal was laid within the cage kept at 25°C, as the operated animal is quite susceptible to temperature change owing to lack of body temperature regulation. For the determination of cholesterol at inanition animals were fasted for a week with only a supply of water.

III. Method of determination.

The animal was bled from carotis, washed with injection of physiological saline solution into the jugular vein, until the outcoming fluid became colorless. Brain, liver, lung, kidney, heart and skeletal muscle were taken out and subjected to cholesterol determination.

1. *Extraction of cholesterol.*

A certain amount of minced tissue was digested at 80° for 30–60 minutes with addition of equal volume of 2 per cent sodium hydroxide solution. The cooled mixture was transferred into a separating funnel of 200 250 cc. size quantitatively, by means of water and extracted with 100 cc. of ether and 30 cc. of acetone. The watery solution was extracted again with 100 cc. of ether twice. The collected etherial solution was washed with 5 cc. of 1% sodium hydroxide solution in separating funnel of 500 cc. size. After two succeding washings with 5 cc. of water each, the ether was distilled and the residue was dissolved and transferred into a beaker with 30 cc. of acetone. Acetone was evaporated off on the water bath. The residue was taken up with 30 cc. of absolute ether, clarified through an asbestos filter. Ether was then evaporated and the residue was taken up with acetone and passed through an asbestos filter. The clear acetone solution was evaporated dry again on water bath and the residue was taken up with chloroform, transferred into a measuring flask and filled up to the mark.

2. *Estimation of free cholesterol.*

A portion of the above mentioned cholesterol extract, containing 1–3 mgm. of cholesterol is placed into a small beaker and freed from choloroform by evaporation, dissolved into 2 cc. of pure acetone at the temperature of 40–50°C, and added with 2 cc. of 1 per cent solution of digitonine in alcohol (80% alcohol). The precipitate is placed at room temperature overnight, and transferred into a centrifuge tube by means of 80% acetone, warmed up to 40–50°C, stirred occasionally for about 10 minutes. The centrifuged supernatant fluid was filtered through asbestos filter. The beaker used for precipitation was rinsed with 10 cc. of 80% acetone and the washing transferred into the centrifuge tube, stirred thoroughly with a glas rod and centrifuged again. The supernatant fluid was filtered through the same asbestos filter. Washing and centrifugation were repeated once more. The precipitate was then thoroughly transferred over asbestos filter with acetone, washed with 5 cc. of ether three times under stirring, succeded with washing by pure acetone. Finally the precipitate was washed with water three times and dried at 105–110°C in vacuum, to a constant weight. The weight of the dried precipitate was measured by means of microbalance. The reading multiplied by 0.2431 gives the amount of free cholesterol.

3. *Estimation of ester cholesterol.*

The amount of ester cholesterol was determined by the difference of total and free cholesterol. The total cholesterol was determined after saponification into free cholesterol by heating a certain amount of cholesterol extract with 10 cc. of saturated alcoholic alkali-solution for 6 hours in water bath at 80°C under reflux condenser. The extraction and estimation of free cholesterol thus saponified were performed just the same as above mentioned. The weight of cholesterol digitonide multiplied by 0.25 gives the amount of total cholesterol. This amount substracted by the weight of free cholesterol represents the amount of ester cholesterol in the extract.

IV. The results of experiments.

1. *Content of free and ester cholesterol in various organs and tissues of normal male cats.*

To elucidate the behaviour of cholesterol within the animal body the normal distribution of cholesterol must be determined at first. All male cats weighing from 2500 to 3000 gm. were fed on rice, fish and a little of miso for about 1–2 weeks. After 24 hours fasting, the animals were bled and all the blood vessels were washed out by injecting physiological saline solution. The organs and tissues examined were brain, kidney, liver, lung, heart and skeletal muscle.

The results of the determination of cholesterol are given in table I. The amount is given by referring to wet tissue.

As may be seen from the Table I, the normal content of free and ester cholesterol of these organs and tissues are fairly constant and change only within a small amount.

2. *Effect of extirpation of the adrenal gland.*

Cats, adrenalectomized under ether anaesthesia as above described, soon recover from narcosis after one hour, and on the next dry can drink a little of milk and eat diet.

On the 2nd or 3rd day following adrenalectomy there appeared the symptome of adrenal insufficiency, consisting of onset of anorexia, the loss of body weight and the fatal weakness. The animal swayed unsteadily from side to side when walking, and they were not willing to walk, their tendency being to lie around or to sleep more than usual. The animal began vomiting on the fifth or sixth day of the experiment, and showed continuous salivation. There was usually diarrhea and feces often contained blood. The adrenalectomized animal died usually within about 7 to 10 days after removal of both adrenals in this experiment. At autopsy, bile and ulcers in the stomach were observed practically always. After 7 days following bilateral adrenalectomy, the animals were killed and the cholesterol contents of organs and tissues were determined. The results are given in Table II.

TABLE I.

Normal cat.

Organ or tissue	Cat No.	Total cholesterol %	Free cholesterol %	Ester cholesterol %	Ester ch. / Free ch.
Brain	1	3.303	2.942	0.361	0.123
	2	2.504	2.222	0.282	0.127
	3	2.452	2.264	0.188	0.083
	average	2.753	2.476	0.277	0.111
	difference	0.851	0.720	0.173	0.044
Kidney	1	0.385	0.345	0.040	0.116
	2	0.310	0.250	0.060	0.240
	3	0.427	0.370	0.057	0.154
	4	0.398	0.355	0.043	0.121
	5	0.342	0.311	0.031	0.100
	average	0.372	0.326	0.046	0.146
	difference	0.117	0.120	0.029	0.140
Lung	1	0.319	0.283	0.036	0.127
	2	0.452	0.423	0.029	0.069
	3	0.505	0.458	0.047	0.103
	5	0.481	0.456	0.025	0.055
	average	0.439	0.405	0.034	0.089
	difference	0.186	0.175	0.022	0.072
Liver	1	0.236	0.164	0.072	0.439
	2	0.346	0.258	0.088	0.341
	4	0.207	0.166	0.041	0.247
	average	0.263	0.196	0.067	0.342
	difference	0.139	0.094	0.047	0.192
Heart muscle	1	0.141	0.127	0.014	0.110
	2	0.156	0.124	0.032	0.258
	3	0.184	0.132	0.052	0.394
	average	0.160	0.128	0.033	0.254
	difference	0.043	0.008	0.038	0.284
Skeletal muscle	1	0.085	0.076	0.009	0.118
	3	0.073	0.065	0.008	0.123
	4	0.054	0.047	0.007	0.108
	5	0.063	0.054	0.009	0.191
	average	0.069	0.061	0.008	0.138
	difference	0.031	0.029	0.002	0.083

TABLE II.

Adrenalectomized cat.

Organ or tissue	Cat No.	Total cholesterol %	Free cholesterol %	Ester cholesterol %	Ester ch. / Free ch.
Brain	1	2.387	2.356	0.031	0.013
	2	2.397	2.236	0.161	0.072
	3	2.312	2.289	0.023	0.010
	4	2.464	2.386	0.078	0.033
	average	2.390	2.317	0.073	0.032
	normal	2.753	2.476	0.277	0.111
Kidney	1	0.479	0.359	0.120	0.334
	3	0.421	0.305	0.116	0.380
	4	0.503	0.281	0.222	0.790
	average	0.468	0.315	0.153	0.501
	normal	0.372	0.326	0.046	0.146
Lung	1	0.353	0.320	0.033	0.103
	2	0.410	0.387	0.023	0.059
	3	0.429	0.393	0.036	0.092
	4	0.428	0.366	0.062	0.169
	average	0.405	0.367	0.039	0.106
	normal	0.439	0.405	0.034	0.089
Liver	1	0.235	0.215	0.020	0.093
	2	0.232	0.201	0.028	0.139
	3	0.254	0.221	0.033	0.149
	4	0.232	0.219	0.013	0.059
	average	0.238	0.214	0.024	0.110
	normal	0.263	0.196	0.067	0.342
Heart muscle	1	0.251	0.198	0.053	0.268
	3	0.138	0.130	0.008	0.061
	4	0.148	0.105	0.043	0.409
	average	0.179	0.144	0.035	0.246
	normal	0.160	0.128	0.033	0.254
Skeletal muscle	1	0.121	0.092	0.029	0.315
	2	0.048	0.042	0.006	0.143
	4	0.063	0.053	0.010	0.189
	average	0.077	0.062	0.015	0.216
	normal	0.069	0.061	0.008	0.138

As can be seen from the table, there is a considerable change in the amount of ester cholesterol in brain, liver and kidney. Namely, the ester cholesterol contents in brain and liver is decreased, while the reverse is observed in kidney. In lung, heart and skeletal muscle, there is no notable change observable. The change becomes more evident when we consider the ratio between ester cholesterol and free cholestrol.

3. *Effect of inanition.*

Animal, in which the adrenal glands were entirely extirpated, takes almost no food. The change observed in these animals might be therefore introduced by more inanition. This condition necessitated us to study the effect of inanition on cholesterol content of tissue. In the next experiment animals were fasted for 7 days allowing only access to water and determined its cholesterol content of their organs and tissues. The results are given in Table III.

As can be seen from the table, the cholesterol content remains almost the same as in normal condition, and no specific change due to the inanition could be observed.

4. *Effect of cortical extract under adrenalectomy.*

To find out whether the daily injection of cortical hormone to the suprarenalectomized animal gives any effect on the change of ester-free-cholesterol ratio observed in adrenalectomized animal, experiment with cortical extract was next followed. In our experiment, we prepared the cortical hormone from beef adrenal glands following mainly the method of Swingle and Pfiffner (1931).

Preparation of extract was given briefly as follows.

In the slaughter house, the beef adrenal glands were quickly freed from fat and connective tissue, and packed with solid carbon dioxide (commercial dry ice). The frozen tissues were ground in an ordinary meat grinder and mixed with 2.5 volumes of 95% alcohol and allowed to stand for overnight at room temperature with occasional shaking. The mixture was pressed out with a press and the gland residue again re-extracted in a similar manner for overnight with 2 volumes of 80% alcohol. The alcoholic

TABLE III.

Inanition.

Organ or tissue	Cat No.	Total cholesterol %	Free cholesterol %	Ester cholesterol %	Ester ch. / Free ch.
Brain	1	2.717	2.416	0.301	0.125
	2	2.751	2.501	0.250	0.100
	average	2.734	2.459	0.276	0.113
	normal	2.753	2.446	0.277	0.111
Kidney	1	0.368	0.303	0.065	0.215
	2	0.357	0.315	0.042	0.133
	average	0.363	0.309	0.054	0.174
	normal	0.372	0.326	0.046	0.146
Lung	1	0.437	0.399	0.038	0.095
	2	0.448	0.405	0.043	0.106
	average	0.443	0.402	0.041	0.101
	normal	0.439	0.405	0.034	0.089
Liver	1	0.244	0.198	0.046	0.232
	2	0.237	0.186	0.051	0.274
	average	0.241	0.192	0.049	0.253
	normal	0.263	0.196	0.067	0.342
Heart muscle	1	0.149	0.119	0.030	0.252
	2	0.155	0.129	0.026	0.202
	average	0.152	0.124	0.028	0.227
	normal	0.160	0.128	0.033	0.254
Skeletal muscle	1	0.061	0.055	0.006	0.109
	2	0.081	0.070	0.011	0.157
	average	0.071	0.063	0.009	0.133
	normal	0.069	0.061	0.008	0.138

extracts were combined and concentrated in vacuo in water bath at 45–55°C to about one-fifteenth their original volumes. The syrup was transferred to a measuring cylinder with 2 volumes of pure acetone. After standing overnight in refrigerator, the mixture was filtered through soft paper, and residue was re-extracted

with acetone. The all combined acetone solution was removed completely from acetone in vacuo at 45°C. The residue was transferred to a flask by means of 30 cc. of petroleum ether (B. p. 30 or 40–60°) and 74 cc. of 95% alcohol, and into it 26 cc. of distilled water was added and well mixed. The 70% alcohol layer was separated and washed several times with 30 cc. portions of petroleum ether. If the mixture was not easily separable, it was done by centrifugation. At last the washing gave a negative cholesterol color reaction. The 70% alcohol was then slowly passed through a column of permutit (commercial zeolite) layer. The filtrate was evaporated completely in vacuo at 45°C. The residue was dissolved in pure benzene and filtered. The filtrate was evaporated completely in vacuo at 45°C and dissolved in 95% alcohol. The alcoholic solution was passed through the permutit column once more. The obtained filtrate was clear and very pale yellow in color. This solution showed pH 5.2 and gave negative cholesterol color reaction, negative Pauly reaction, and no digitonide. We could not prove the existence of adrenalin by the Bioassay method. The extract can be preserved in refrigeration, 1 cc. of this extract corresponded to 2 gm. of fresh glands. Before using, the extract was evaporated and added with 2 to 3 cc. of sterile water. The bilaterally adrenalectomized animals were injected with this extract subcutaneously, once daily in amount equivalent to 80-120 gm. of fresh glands. The results of determination of cholesterol content on these adrenalectomized and cortin-treated cats at 8th day after the operation are recorded in Table IV.

As is clear from the table, the daily injection of cortical hormone to the adrenalectomized animal prevents or slows down the effect of adrenalectomy on the cholesterol content of tissues. Therefore we might be allowed to assume that the change on cholesterol content observed in adrenalectomized animal is due to the lack of cortical hormone.

TABLE IV.

Cortical extract injection after adrenalectomy.

Organ or tissue	Cat No.	Total cholesterol %	Free cholesterol %	Ester cholesterol %	Ester ch. / Free ch.
Brain	1	2.251	2.048	0.203	0.099
	2	2.603	2.360	0.243	0.103
	3	2.324	2.153	0.171	0.079
	4	2.517	2.307	0.210	0.091
	average	2.424	2.217	0.207	0.093
	normal	2.753	2.476	0.277	0.111
Kidney	1	0.349	0.297	0.052	0.175
	2	0.357	0.258	0.099	0.384
	3	0.363	0.262	0.101	0.385
	4	0.292	0.261	0.031	0.119
	average	0.341	0.270	0.071	0.266
	normal	0.372	0.326	0.046	0.146
Lung	1	0.366	0.294	0.072	0.245
	2	0.339	0.308	0.031	0.101
	3	0.399	0.358	0.041	0.115
	4	0.404	0.372	0.032	0.086
	average	0.377	0.333	0.044	0.139
	normal	0.439	0.405	0.034	0.089
Liver	2	0.230	0.169	0.061	0.361
	3	0.212	0.184	0.024	0.152
	4	0.239	0.199	0.040	0.020
	average	0.227	0.184	0.042	0.178
	normal	0.263	0.196	0.067	0.342
Heart muscle	1	0.159	0.125	0.034	0.272
	2	0.141	0.131	0.010	0.076
	3	0.124	0.122	0.002	0.016
	4	0.129	0.119	0 010	0.084
	average	0.138	0.124	0.014	0.112
	normal	0.160	0.128	0.033	0.254
Skeletal muscle	1	0.135	0.118	0.017	0.144
	3	0.060	0.056	0.004	0.073
	4	0.067	0.059	0.008	0.135
	average	0.087	0.078	0.010	0.117
	normal	0.069	0.061	0.008	0.138

Summary.

1. The cholesterol contents of several tissues in a normal cat are determined. Their individual difference seems to be quite small.

2. The fasting animal showed almost no difference in its cholesterol content of tissue with that of normal animals.

3. In adrenalectomized animal the ester cholesterol in brain and liver is greatly decreased, while that of kidney is increased considerably.

4. The change of the cholesterol content observed in adrenalectomized animal may be prevented by the daily injection of cortical hormone.

5. Cortical hormone seems to have some important role in the cholesterol metabolism within the animal body.

I wish to express my sincere thanks to Prof. S. Kakiuchi for his kind advice throughout the course of the investigation.

REFERENCES.

Rothschild (1915): Zieglers' Beiträge., **60**, 39, 66.

Baumann and Holly (1923): J. of biol. chem., **55**, 457.

Lukas (1926): Am. J. of phys., **77**, 114.

Hartman (1927): Am. J. of physiol., **81**, 244.

Handovsky and Tamman (1928): Nannyn-Schniedbergs' Archiv., **134**, 203.

Onizawa (1928): The J. of Bioch., **10**, 42.

„ (1929): „ **10**, 409, 413.

Rogoff and Stewart (1929): Am. J. of phys., **88**, 162.

Reiss (1930): Endokrinologie., **7**, 1.

Swingle and Pfiffner (1931): Am. J. of physiol., **96**, 153, 164, 180; **98**, 144.

Thaddea and Fasshauer (1936): Archiv. für exp. Path. u. Pharm., **182**, 477.

INDEX TO VOLUME 24.

A

Adrenalectomy, The effect of —— on the cholesterol contents of tissues and organs. 483.
Antigen, Das —— der Wassermann'schen Reaktion. 31.
Arginase, Studies über die ——. 447.

B

B-Avitaminose, Umsatz der Fettstoffe in den Nervengeweben der Taube bei der ——. 153.
B-N-Monoacetylglucosaminidase. 297, 305, 315.
Bebeschin, K. W. und Smorodinzew, J. A. Altersveränderungen am Gesamtstickstoff und an den Lipoiden im Kinderhirn. 245.
Benedict and Theis method, A note on the —— — —— —— when applied to determining free phenols in tissues. 215.
Biochemical studies on carbohydrates. 1, 9, 73, 215, 219, 287, 297, 305, 315.
Biochemische Untersuchung über die Naphthalin-Linsenkatarakt. 81.
Blut, Über die Bestimmung der Fettstoffe im Blut. 257.
Blut, Über fermentative Dehydrierung der Hefe- Nukleinsäure im ——e. 133.
Blutzucker, Beiträge zur Kenntnis des sogenannten gebundenen ——s. 225, 355.

C

Canalin, The synthesis of ——. 107.
Canavanin, Studies on a diaminoacid, ——. 107.
Carbohydrate, Biochemical studies on ——s. 1, 9, 73, 215, 219, 287, 297, 305, 315.
Carboxylase, Über die Extraktion der Phosphatase und der —— der Hefe. 367.
Chick, Behaviours of mucoids of egg white and of yolk during the development of ——. 9.
Cholesterol, The effect of adrenalectomy on the —— contents of tissues and organs. 483.
Cholesterol, Further contributions to the micro determination of ——. 429.
Cholin, Abtrennung des ——s aus dem Lecithin durch die Takadiastase. 21.
Co-Fermente, Über die Mitwirkung des ——s auf Dehydrierung durch Gegenwart von Nucleinsäure-dehydrogenase. 423.
Cystine, On the —— content of hair and feathers. 207.

D

Diaminoacid, Studies on a ——, canavanin. 107.
Dünndarmschleimhaut, Über die proteolytischen Fermente des Mazerationssaftes von Pankreas und —— des Kaninchens. 139.

E

Enzyme, Spectroscopic studies on purified ——s. 279.
Enzyme action, Kinetics of the —— ——. 327.

Erythrocyten, Über die Phosphorsäureveresterung in ——. 461.

F

Fat-carbohydrate metabolism, Experimental studies on the influence of high-fat diet upon the —— ——. 407.

Fat, A contribution to the —— metabolism. 407.

Feather, On the cystine content of hair and ——s. 207.

Ferment, Über die proteolytischen ——e des Pankreassaftes. 267.

Fermentative Dehydrierung, Über —— —— der Hefe-Nukleinsäure. 127, 133.

Fettstoff, Über die Bestimmung der ——e im Blut. 257.

Fettstoff, Umsatz der ——e in den Nervengeweben der Taube bei der B-Avitaminose. 153.

Free phenol, A note on the Theis and Benedict method when applied to determining —— ——s in tissue. 215.

G

Gesamtstickstoff, Altersveränderungen am —— und an den Lipoiden im Kinderhirn. 245.

H

Hair, On the cystine content of —— and feathers. 207.

Harn, Über die Wirkung des ——s schwangerer Frauen auf the Sauerstoffatmung des Ovariums. 337.

Hefe-Nukleinsäure, Über fermentative Dehydrierung der —— - ——. 127, 133.

Hefe, Über die Extraktion der Phosphatase und der Carboxylase der ——. 367.

I

Ichioka, Fuyutaro. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des Kaninchens.
I. Mitteilung. Über die proteolytischen Fermente des Mazerationssaftes von Pankreas und Dünndarmschleimhaut des Kaninchens. 139.
II. Mitteilung. Über die proteolytischen Fermente des Pankreassaftes. 267.

Itoh, Ryoji. Spectroscopic studies on purified enzymes. III. Report. On lipase, urease and tyrosinase. 279.

Iwabuchi, Takeo. Studies über die Arginase. 447.

Izawa, Shozo und Kan-ichi Kiyohara. Über die Wirkung des Harns schwangerer Frauen auf die Sauerstoffatmung des Ovariums. 337.

K

Kaninchen, Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des ——s. 139, 267.

Kaninchen, Über die proteolytischen Fermente des Mazerationssaftes von Pankreas und Dünndarmschleimhaut des ——s. 139.

Katai, Kitaro and Okuda, Yuzuru. On the cystine content of hair and features. 207.

Kinderhirn, Altersveränderungen am Gesamtstickstoff und an den Lipoiden im ——. 245.

Kitagawa, Matsunosuke. Studies on

a diaminoacid, canavanin. V. The synthesis of canalin. 107.

KITASATO, Torao. Über Xyleno-β-d-Glucoside. 327.

KIYOHARA, Kan-ichi und Shozo IZAWA. Über die Wirkung des Harns schwangerer Freuen auf die Sauerstoffatmung des Ovariums. 337.

KOBAYASHI, Choe. Über die Extraktion der Phosphatase und der Carboxylase der Hefe. 367.

L

Lecithin, Abtrennung des Cholins aus dem —— durch die Takadiastase. 21.

Liebermann-Burchard reaction, On the —— —— of bound cholesterol. 443.

Lipase, On ——, urease and tyrosinase. 279.

Lipoid, Altersveränderungen am Gesamtstickstoff und an den ——en im Kinderhirn. 245.

Lysolezithin, Über die fermentative —— bildung. 389.

M

MASAMUNE, Hajime and HOSHINO, Susumu. On the prosthetic group of ovomucoid. 219.

MATSUOKA, Yoshimasa. III. Mitteilung: Über den Einfluss der Pankreas- und Nebennierenfunktion auf den sogenannten gebundenen Blutzucker. 225.
IV. Mitteilung. Über die Bedeutung des reticuloendothelialen Systems für den sog. geb. Blutzucker. 355.

Mazerationssaft, Über die proteolytischen Fermente des ——es von Pankreas und Dünndarmschleimhaut des Kaninchens. 139.

Micro determination, Further contributions to the —— —— of cholesterol. 429.

MIYAZAKI, Masaki. A contribution to the fat metabolism. The first Experimental studies on the influence of high fat diet upon the fat-carbohydrate metabolism. 407.

MORIYAMA, Miyoji. Biochemische Untersuchung über die Naphthalin-Linsenkatarakt. 81.

Mucoid, Behaviours of ——s of egg white and of yolk during the development of chick. 9.

Muskel, Über fermentative Dehydrierung der Hafe-Nukleinsäure im ——. 127.

N

N-monoacetyl glucosamine. 287.

Naphthalin-Linsenkatarakt, Biochemische Untersuchung über die —— ——. 81.

Nebennierenfunktion, Über den Einfluss der Pankreas- und —— auf den sogenannten gebundenen Blutzucker. 225.

Nervengeweben, Umsatz der Fettstoffe in den —— der Taube bei der B-Avitaminose. 153.

Nucleinsäure, Gewebsoxydation der ——. 127, 133, 423.

O

OGAWA, Konosuke. Über die Fermentative Lysolezithinbildung. 389.

OKUDA, Yuzuru and KATAI, Kitaro. On the cystine content of hair and feathers. 207.

ONOE, Tamenobu. Biochemical studies on carbohydrates.

XVI. "Vitellomucoid." 1.
XVII. Behaviours of mucoids of egg white and of yolk during the development of chick. 9.
Organ, The effect of adrenalectomy on the cholesterol contents of tissues and ——s. 483.
Ovarium, Über die Wirkung des Harns schwangerer Frauen auf die Sauerstoffatmung des ——s. 337.
Ovomucoid, On the prosthetic group of ——. 219.
OZAKI, Genei. Biochemical studies on carbohydrates. XVIII. On the carbohydrate complex of serum mucoid. 73.

P

Pankreas, Über den Einfluss der —— und Nebennierenfunktion auf den sogenanten gebundenen Blutzucker. 225.
Pankreas, Über die proteolytischen Fermente des Mazerationssaftes von —— und Dünndarmschleimhaut des Kaninchens. 139.
Pankreasdrüse, Über die proteolytischen Fermente der —— des Kaninchens. 139, 267.
Pankreassafte, Über die proteolytischen Fermente des ——s. 267.
Phosphatase, Über die Extraktion der —— und der Carboxylase der Hefe. 367.
Phosphorsäureveresterung, Über die —— in Erythrocyten. 461.

R

REMESOV, Igor. Dependence of the biological effect of sexual hormones on their chemical structure. 113.
Reticuloendothelialen System, Über die Bedeutung des —— ——s für den sog. geb. Blutzucker. 355.

S

SAKAKIBARA Ihoe. Das Antigen der Wassermann'schen Reaktion. 31.
Serum mucoid, On the carbohydrate complex of —— ——. 73.
Sexual hormone, Dependence of the biological effect of —— ——s on their chemical structure. 113.
SMORODINZEW, J. A. und K. W. BEBESCHIN. Altersveränderungen am Gesamtstickstoff und an den Lipoiden im Kinderhirn. 245.
Spectroscopic studies on purified enzymes. 279.

T

Takadiastase, Abtrennung des Cholins aus dem Lecithin durch die ——. 21.
TAKATA, Yasuwo. Über die Bestimmung der Fettstoffe im Blut. 257.
TAKATA, Yasuwo. Umsatz der Fettstoffe in den Nervengeweben der Taube bei der B-Avitaminose. 153.
Taube, Umsatz der Fettstoffe in den Nervengeweben der —— bei der B-Avitaminose. 153.
Theis and Benedict method, A note on the —— — —— —— when applied to determining free phenols in tissues. 215.
Tissue, A note on the Theis and Benedict method when applied to determining free phenols in ——s. 215.
Tissue, The effect of adrenalectomy on the cholesterol contents of ——s and organs. 483.
TSUGE, Yukio. Gewebsoxydation der Nukleinsäure. II. Mitteilung:

Über fermentative Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Muskel. 127.
III. Mitteilung: Über fermentative Dehydrierung der Hefe-Nukleinsäure im Blute. 133.
IV. Mitteilung: Über die Mitwirkung des Co-Fermentes auf Dehydrierung durch Gegenwart von Nucleinsäuredehydrogenase. 423.

U

Urease, On lipase, —— and tyrosinase. 279.

V

Vitellomucoid. 1.

W

Wassermann'sche Reaktion, Das Antigen der —— ——. 31.
WATANABE, Kuniichi. Biochemical studies on carbohydrates. XIX. A note on the Theis and Benedict method when applied to determining free phenols in tissue. 215.
XXI. Assimilability and disintegration chemism of N-monoacetylglucosamine. 287.
XXII. On animal B-N-monoacetylglucosaminidase. Preliminary report. 297.
XXIII. On animal B-N-monoacetylglucosaminidase. II. Report: Purification of the enzyme. 305.
XXIV. On animal B-N-monoacetylglycosaminidase. III. Report: Kinetics of the enzyme action. 315.

X

Xylenol-*β*-*d*-glucoside. 327.

Y

YAMAMOTO, Kumakichi. Über die Phosphorsäureveresterung in Erythrocyten. 461.
YASUDA, Morio. Further contributions to the micro determination of cholesterol. 429.
YASUDA, Morio. On the Liebermann-Burchard reaction of bound cholesterol. 443.
YASUE, Shun-ichi. The effect of adrenalectomy on the cholesterol contents of tissues and organs. 483.
YOSHINAGA, Tosio. Spaltung des Lecithin. Abtrennung des Cholins aus dem Lecithin durch die Taka-diastase. 21.